



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) **PI0707249-0 A2**

(22) Data de Depósito: 29/01/2007
(43) Data da Publicação: 26/04/2011
(RPI 2103)



(51) *Int.Cl.:*
G01N 33/574

(54) Título: **MÉTODOS PARA IDENTIFICAR PACIENTES COM MAIOR PROBABILIDADE DE TEREM CÂNCER DE OVÁRIO E COMPOSIÇÕES PARA OS MESMO**

(30) Prioridade Unionista: 27/01/2006 US 60/762.760

(73) Titular(es): Tripath Imaging, INC

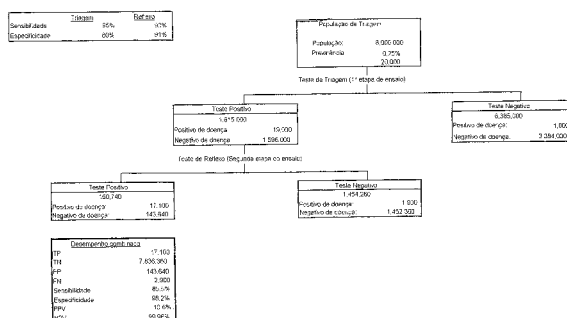
(72) Inventor(es): Clark M. Whitehead, Douglas P. Malinowski, John W. Groelke, Qin He, Robert L. Cheek, Timothy J. Fischer

(74) Procurador(es): FLAVIA SALIM LOPES

(86) Pedido Internacional: PCT US2007061205 de 29/01/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007/090076 de 09/08/2007

(57) **Resumo:** METODOS PARA IDENTIFICAR PACIENTES COM MAIOR PROBABILIDADE DE TEREM CÂNCER DE OVÁRIO E COMPOSIÇÕES PARA OS MESMO. São fornecidos métodos de triagem para identificar pacientes com probabilidade aumentada de terem câncer de ovário. Os métodos de triagem envolvem a detecção de expressão de uma pluralidade de biomarcadores em uma amostra de corpo, em que a superexpressão dos biomarcadores é indicativa de probabilidade aumentada de ter câncer de ovário. Os métodos de triagem podem compreender ainda uma análise de duas etapas. Biomarcadores de interesse incluem genes e proteínas que estão, por exemplo, envolvidos em defeitos em replicação de DNA/control de ciclo de célula, crescimento e proliferação de células, escape de apoptose, angiogênese ou linfogênese, ou os mecanismos de motilidade e invasão de células de câncer. Em alguns aspectos da invenção, a expressão de um biomarcador é detectada no nível de proteína utilizando um anticorpo específico de biomarcador ou no nível de ácido nucleico utilizando técnicas de hibridização de ácido nucleico. Os métodos para detectar câncer de ovário em pacientes são adicionalmente revelados aqui. Kits para pôr em prática os métodos da invenção são adicionalmente fornecidos.



**MÉTODOS PARA IDENTIFICAR PACIENTES COM MAIOR PROBABILIDADE
DE TEREM CÂNCER DE OVÁRIO E COMPOSIÇÕES PARA OS MESMOS**

Campo da invenção

A presente invenção refere-se a métodos e composições
5 para identificar mulheres com probabilidade aumentada de
terem câncer de ovário.

Antecedentes da invenção

O câncer de ovário representa um grupo heterogêneo de
doenças que afetam mulheres em uma base global. Há várias
10 formas de câncer de ovário que incluem câncer epitelial,
câncer de linha germinativa dos ovários e câncer estromal
de ovário. Câncer epitelial de ovário representa a forma
mais comum da doença. Aproximadamente 5-10% de câncer
epitelial de ovário representa uma forma hereditária da
15 doença e três padrões comuns são reconhecidos: câncer de
ovário sozinho; câncer de mama e ovário ligado à ligação
genética BRAC1 e BRCA2 em cromossomos 17q21 e 13q12
respectivamente; e câncer de cólon e ovário. O fator de
risco mais importante para câncer de ovário é um primeiro
20 grau relativo à doença (por exemplo, uma mãe, irmã ou filha
com câncer de ovário). Vide, por exemplo, Partridge e
outros (1999) CA-A Cancer Journal for Clinicians 49:297-
320. Em 2005, houve uma estimativa de 22.000 novos casos de
diagnósticos de câncer de ovário e 16.000 óbitos de câncer
25 de ovário. Vide genericamente o website da American Cancer
Society em www.cancer.org; website do National Cancer
Institute em www.cancer.gov. O câncer de ovário é uma
doença que afeta principalmente mulheres pós-menopausa com
a idade mediana para diagnóstico em 63 anos de idade.
30 Entretanto, a doença pode afetar mulheres em todos os

grupos de idade. National Cancer Institute Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) Program em www.seer.cancer.gov.

A classificação de estágio de câncer de ovário se baseia na extensão de localização versus difusão da doença 5 além dos ovários. O câncer de ovário estágio 1 é confinado a um ou ambos os ovários. A doença no estágio 2 envolve um tumor em um ou ambos os ovários com extensão pélvica. No câncer de ovário estágio 3, um tumor está presente em um ou 10 ambos os ovários com metástase peritoneal microscopicamente confirmada fora da pélvis e/ou metástase de linfonodo regional. O câncer de ovário estágio 4 é caracterizado por metástase distante fora da cavidade peritoneal. O câncer de ovário é genericamente diagnosticado em um estado avançado 15 da doença devido à ausência de sintomas clínicos específicos que indicariam a presença de tumores pequenos. Para mulheres com menos de 50 anos de idade, menos de 40% dos cânceres de ovários são detectados quando os tumores estão localizados em um ou ambos os ovários e quando o 20 prognóstico da doença é melhor. Para mulheres acima da idade de 50, o número cai para menos de 15%. Aproximadamente 68% de mulheres de todos os grupos de idade afligidos com câncer de ovário não são diagnosticadas até que metástase distante esteja presente. Vide genericamente 25 National Cancer Institute Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) Program em www.seer.cancer.gov.

O câncer de ovário se espalha através de desprendimento local a partir do epitélio do ovário para dentro da cavidade peritoneal seguido por implantação no 30 peritônio e invasão local do intestino e bexiga. A presença

de envolvimento de linfonodo em câncer de ovário é evidente em todos os estágios de câncer de ovário diagnosticado. A percentagem de linfonodos positivos aumenta significativamente com a progressão da doença (isto é, 5 Estágio 1, 24%; estágio 2, 50%, estágio 3, 74%; estágio 4, 73%). Id.

A sobrevivência de pacientes com câncer de ovário é uma função do estágio no qual a doença é diagnosticada, com a sobrevivência de 5 anos diminuindo com doença avançada. 10 Mais de 90% de mulheres diagnosticadas com câncer de ovário no Estágio 1 sobrevivem por menos 5 anos após o diagnóstico. A taxa de sobrevivência de 5 anos cai para menos de 30% quando a doença não é diagnosticada até o Estágio 4 (isto é, metástase distante). Id.

15 O câncer epitelial de ovário é a forma mais comum da doença. Há quatro classes histológicas principais reconhecidas de câncer epitelial de ovário e incluem subtipos serosos, endometrióide, célula clara e com mucina. A patogênese de câncer de ovário é pouco entendida, porém, 20 acredita-se que se origine do epitélio de superfície de ovário. Vide Bell (2005) Mod. Pathol. 18 (Suppl 2): S19-32. Fatores de vida que fornecem a maior redução em risco de câncer de ovário incluem multiparidade, uso de contraceptivos orais, e amamentação, todos os quais evitam 25 a ovulação. Como a ovulação resulta em dano epitelial, seguido por reparo e possíveis respostas inflamatórias, a repetição desse processo durante toda a vida reprodutiva da mulher sem interrupção parece levar a dano de células e aumentar o risco de câncer de ovário. Vide, por exemplo, 30 Ness e outros (1999) J. Natl. Cancer Inst. 91:1459-1467.

Entretanto, não há progressão escalonada reconhecida de
câncer de ovário através de lesões precursoras definidas,
como aquelas reconhecidas tanto para carcinoma cervical
como câncer de cólon. Conseqüentemente, pesquisa
5 considerável tem sido dirigida à compreensão da base
molecular para câncer de ovário e para entender as
diferenças básicas entre os vários subtipos histológicos de
câncer de ovário. Esses estudos utilizaram análise de
expressão de gene para fornecer essa compreensão e
10 identificaram uma série de biomarcadores em potencial para
avaliação em aplicações diagnósticas. Vide, por exemplo,
Ono e outros (2000) Cancer Res. 60:5007-11; Welsh e outros
(2001) Proc. Natl. Acad. Sci USA 98:1176-1181; Donninger e
outros (2004) Oncogene 23:8065-8077; e Lee e outros (2004)
15 Int. J. Oncol. 24(4):847-851.

O Câncer de ovário é freqüentemente detectado com a
apresentação de sintomas clínicos evidentes, mais
notadamente a apresentação de dor abdominal, uma massa
anexa, distensão abdominal e urgência urinária. Como tal, a
20 detecção de câncer de ovário é freqüentemente detectada em
um estágio avançado, quando o prognóstico e resultado
clínico são ruim. A detecção de câncer de ovário em um
estágio inicial (isto é, Estágio 1) resulta em uma taxa de
cura de aproximadamente 90% utilizando cirurgia padrão e
25 quimioterapia; conseqüentemente há necessidade clínica de
detectar câncer de ovário em um estágio inicial onde o
tratamento será mais eficaz. Infelizmente, métodos de
triagem atuais para detectar câncer de ovário no estágio
inicial são insuficientes. A prática atual para triagem de
30 câncer de ovário emprega o uso de CA125 e ultra-som

transvaginal (sonografia). Níveis de soro em elevação de CA125 são associados a câncer de ovário e utilização subsequente de ultra-som transvaginal ajuda a detectar a presença de câncer de ovário. A confirmação de doença de ovário se baseia em procedimentos invasivos como laparotomia. Entretanto, o uso de CA125 é ineficaz para triagem de população geral devido a questões de sensibilidade limitada, especificidade limitada, e um valor predizível positivo ruim de <3%. Bast (2003) J. Clin. Oncol. 21 (10 Suppl):200-205. Como resultado, não há consenso sobre as recomendações para triagem genericamente em relação a câncer de ovário na população de pacientes assintomáticos. Vide o website do National Cancer Institute em www.cancer.gov. Para pacientes de alto risco, os procedimentos genericamente aceitos para a detecção de câncer de ovário incluem o uso de exames pélvicos, o uso de teste de soro CA125, e ultra-som transvaginal (sonografia). Partridge e outros (1999) CA-A Cancer Journal for Clinicians 49:297-320.

CA125 é um marcador de tumor bem caracterizado normalmente expresso na superfície de células epiteliais e é freqüentemente detectado no soro de pacientes normais em 35U/ml. Níveis elevados de soro de CA125 (>35U/mL) são freqüentemente detectados em aproximadamente 83% de pacientes com câncer do ovário; os 15% restantes de pacientes com câncer de ovário têm níveis de soro normais de CAS125. Além disso, CA125 é elevado somente em 50% de pacientes com câncer de ovário estágio 1, desse modo limitando sua utilidade clínica na detecção prematura de câncer de ovário. Entretanto, níveis elevados de soro de

CA125 são utilizados para a monitoração de recorrência de doença após intervenção terapêutica e isso representa o uso atualmente aprovado para CA125 pela FDA. Além disso, níveis elevados de soro de CA125 são predizíveis de câncer de ovário detectável no futuro.

As taxas baixas de prevalência de câncer de ovário na população em geral criam desafios significativos para o desenvolvimento de um teste de triagem que promoveria detecção prematura da doença. Métodos de triagem para doenças com baixas taxas de prevalência como câncer de ovário resultam freqüentemente em uma razão elevada de positivos falsos para positivos verdadeiros que limita a utilidade clínica de tais programas de triagem. Dados os riscos significativos associados à exploração cirúrgica para possível câncer de ovário, um teste de triagem clinicamente útil deve encaminhar para cirurgia não mais do que 10 mulheres para toda mulher que tenha efetivamente câncer de ovário (isto é, um valor predizível positivo (PPV) de pelo menos 10%). Skates e outros (2004) J. Clin. Oncol. 22:4059-4066. PPV é altamente dependente das taxas de prevalência para uma doença ou condição específica e mudará dramaticamente como resultado de diferenças em prevalência de doença. Portanto, com doenças com baixa prevalência, como câncer de ovário, os testes de diagnóstico de triagem com um PPV relativamente baixo têm ainda utilidade clínica significativa. Programas de triagem de câncer de ovário em potencial devem ser ajustados para a baixa prevalência de câncer de ovário e avaliados para desempenho de biomarcador e necessidade clínica. Vide, por exemplo, Skates e outros (2004) J. Clin. Oncol. 22:4059-

4066; Bast e outros (2005) Int. J. Gynecol. Cancer 15:274-281; e Rosen e outros (2005) Gyn. Oncol. 99:267-277. Apesar dos esforços para identificar um biomarcador ou painel de biomarcadores para a detecção, detecção particularmente
5 prematura, de câncer de ovário, não existe atualmente nenhum teste de diagnóstico ou triagem adequado que satisfaça as necessidades clínicas. Métodos atualmente disponíveis, como detecção de CA125, apresentam taxas de positivos falsos, inaceitavelmente elevadas.

10 As recomendações atuais a partir do National Cancer Institute declaram que "há evidência insuficiente para estabelecer que triagem para câncer de ovário com marcadores de soro como CA125, ultra-som transvaginal ou exames pélvicos resultaria em uma diminuição em mortalidade
15 a partir do câncer de ovário" (NCI Summary of Evidence (Level 4, 5); datado de fevereiro de 2005). À luz do risco sério de positivos falsos com as técnicas de triagem atualmente disponíveis, o NCI não apoiou a instituição de procedimentos de triagem em geral para câncer de ovário.
20 Como tal, não existe nenhum teste de triagem padronizado para câncer de ovário, apesar do fato de que o diagnóstico prematuro melhora significativamente as taxas de sobrevivência de 5 anos.

Portanto, existe uma necessidade significativa na
25 técnica por métodos e composições seguras que sejam capazes de identificar especificamente mulheres que têm câncer de ovário. Em particular, são necessários métodos de triagem para identificar pacientes com probabilidade aumentada de ter câncer de ovário. As mulheres identificadas como tendo
30 probabilidade aumentada de ter câncer de ovário poderiam

ser selecionadas para métodos de diagnóstico, mais agressivos, para determinar de forma definitiva se têm atualmente a doença. Além disso, tais métodos de triagem poderiam ser realizados na população de pacientes do sexo
5 feminino em geral em uma base de rotina para facilitar a detecção de câncer de ovário nos estágios iniciais da doença quando prognóstico e resultado de doença são melhores.

Sumário da invenção

10 São fornecidos métodos de triagem para identificar pacientes com probabilidade aumentada de terem câncer de ovário. Os métodos da invenção compreendem genericamente detectar em uma amostra de corpo de paciente a expressão de uma pluralidade de biomarcadores que são seletivamente
15 superexpressos em câncer de ovário. Superexpressão dos biomarcadores é indicativo de uma probabilidade aumentada de que a paciente tenha câncer de ovário. Os métodos da invenção podem compreender, por exemplo, uma análise em "duas etapas", onde uma primeira etapa de ensaio é
20 executada para detectar a expressão de um primeiro biomarcador ou painel de biomarcadores. Se o primeiro biomarcador ou painel de biomarcadores for superexpresso, uma segunda etapa de ensaio é executada para detectar a expressão de um segundo biomarcador ou painel de
25 biomarcadores. A superexpressão do primeiro e segundo biomarcador, ou painéis de biomarcadores, é indicativo de uma maior probabilidade de que a paciente tenha câncer de ovário. A primeira etapa de ensaio pode ser projetada para enriquecer a população de pacientes em exame por eliminar
30 uma grande percentagem de mulheres que são "negativos

verdadeiros". A segunda etapa de ensaio é destinada tipicamente a eliminar aquelas pacientes na população enriquecida que não apresentem câncer de ovário por eliminar pacientes negativos verdadeiros adicionais a partir da população enriquecida. Essas etapas de ensaio podem ser executadas como um teste único que abrange as duas etapas de ensaio ou como dois testes distintos, em que cada teste compreende uma das etapas de ensaio. Um único biomarcador ou painel de biomarcadores pode ser utilizado em cada etapa de análise para obter os valores desejados para sensibilidade, especificidade, valor predizível negativo (NPV), e valor predizível positivo (PPV). Algoritmos podem ser desenvolvidos para combinar biomarcadores específicos nas etapas de ensaio diferentes para obter a sensibilidade, especificidade, NPV ou PPV desejados.

Em outros aspectos da invenção, um método de triagem para identificar pacientes com probabilidade aumentar de terem câncer de ovário compreende executar um ensaio de "etapa única" ou "uma etapa" no qual a superexpressão de uma pluralidade de biomarcadores que são seletivamente superexpressos em câncer de ovário é determinada em uma amostra de corpo de paciente. A superexpressão desses biomarcadores é indicativa de uma probabilidade aumentada da paciente ter câncer de ovário. Ao contrário do método de triagem de duas etapas descrito acima, o ensaio de triagem de etapa única não requer a execução de uma primeira etapa de ensaio para detectar superexpressão de um biomarcador(es) específico seguida por uma segunda etapa de ensaio para determinar se um segundo biomarcador(es) também

é superexpresso para identificar uma paciente com probabilidade aumentada de ter câncer de ovário.

Uma paciente que é identificada pelos métodos de triagem da invenção como tendo probabilidade aumentada de ter câncer de ovário pode ser submetida a testes de diagnóstico adicionais para determinar definitivamente se a paciente tem câncer de ovário. As pacientes que são classificadas como tendo probabilidade aumentada de ter câncer de ovário de acordo com os métodos revelados aqui, porém que são determinadas como não tendo atualmente a doença, são genericamente monitoradas em uma base regular para o desenvolvimento de câncer de ovário. Além disso, os presentes métodos podem ser utilizados para fazer triagem da população de pacientes do sexo feminino em geral em relação a câncer de ovário em uma base de rotina. Desse modo, os métodos de triagem da invenção podem permitir o diagnóstico de câncer de ovário em estágios iniciais da doença quando o prognóstico é significativamente melhor. Kits para pôr em prática os métodos de triagem da invenção também são fornecidos.

A expressão de biomarcador pode ser determinada no nível de proteína ou ácido nucléico. Em algumas modalidades, a expressão de biomarcador é detectada no nível de proteína utilizando anticorpos específicos de biomarcador. A expressão dos biomarcadores da invenção também pode ser detectada pelas técnicas baseadas em ácido nucléico, incluindo, por exemplo, hibridização e RT-PCR. A expressão de biomarcador pode ser determinada em uma variedade de amostras de corpo, incluindo, porém, não limitadas a: sangue (por exemplo, sangue integral; soro de

sangue; sangue tendo plaquetas removidas, etc.); linfa; fluidos ascíticos; urina; fluidos ginecológicos (por exemplo; secreção de ovário; falópio; e uterina; menstruação, etc.); biópsias; e fluidos obtidos durante
5 laparoscopia.

Os métodos para diagnóstico de câncer de ovário em uma paciente também são abrangidos pela presente invenção. Os métodos de diagnóstico compreendem, genericamente, detectar em uma amostra de corpo a expressão de uma
10 pluralidade de biomarcadores que são seletivamente superexpressos em câncer de ovário. A superexpressão da pluralidade de biomarcadores é indicativa da presença de câncer de ovário. Kits para pôr em prática os métodos de diagnóstico da invenção são também fornecidos.

15 Os métodos para determinar a eficácia de uma terapia específica para câncer de ovário em uma paciente são também revelados aqui. A invenção é adicionalmente dirigida a um método para monitorar a regressão ou progressão de câncer de ovário em uma paciente.

20 Breve descrição dos desenhos

A figura 1 provê uma representação esquemática de um teste de triagem de "duas etapas" exemplar para identificar pacientes com probabilidade aumentada de terem câncer de ovário. Os 8 milhões de pacientes mulheres classificadas
25 nesse exemplo representam a população de pacientes dos EUA, assintomáticas, de alto risco, como definido abaixo. Na primeira etapa de ensaio, um número significativo de negativos verdadeiros é eliminado a partir de teste adicional, desse modo deixando uma população enriquecida
30 para análise adicional na segunda etapa de ensaio. A

segunda etapa de ensaio elimina adicionalmente pacientes adicionais que são negativos verdadeiros para identificar aquelas mulheres com o risco mais elevado de terem câncer de ovário. Detalhes adicionais em relação ao método de triagem de duas etapas são fornecidos no texto.

A figura 2 provê os gráficos de Característica operacional de Receptor (ROC) para HE4 obtido com amostras a partir de pacientes acima da idade de 55 (A) e com todas as amostras de pacientes. Detalhes experimentais adicionais são fornecidos no Exemplo 2.

A figura 3 provê os gráficos ROC para inibina A (INH) obtida com amostras a partir de pacientes acima de 55 (A) e com todas as amostras de pacientes. Detalhes experimentais adicionais são fornecidos no Exemplo 2.

A figura 4 provê o gráfico de ROV para prolactina obtido com todas as amostras de pacientes. Detalhes experimentais adicionais são fornecidos no Exemplo 2.

A figura 5 provê o gráfico ROC para PLAU-R obtido com todas as amostras de pacientes. Detalhes experimentais adicionais são fornecidos no Exemplo 2.

A figura 6 provê os gráficos ROC para glicodelina (GLY) obtido com amostras a partir de pacientes acima da idade de 55 (A) e com todas as amostras de pacientes. Detalhes experimentais adicionais são fornecidos no Exemplo 2.

A figura 7 provê o gráfico ROC para SLPI obtido com todas as amostras de pacientes. Detalhes experimentais adicionais são fornecidos no Exemplo 2.

A figura 8 provê o gráfico ROC para CTHRC1 obtido com todas as amostras de pacientes. Detalhes experimentais

adicionais são fornecidos no Exemplo 2.

A figura 9 provê o gráfico ROC para PAI-1 obtido com todas as amostras de pacientes. Detalhes experimentais adicionais são fornecidos no Exemplo 2.

5 A figura 10 provê o gráfico ROC para KLK-10 obtido com todas as amostras de pacientes. Detalhes experimentais adicionais são fornecidos no Exemplo 2.

10 A figura 11 provê os gráficos ROC para CA125 obtido com amostras a partir de pacientes acima da idade de 55 (A) e com todas as amostras de pacientes. Detalhes experimentais adicionais são fornecidos no Exemplo 2.

A figura 12 provê o gráfico ROC para KLK-6 obtido com todas as amostras de pacientes. Detalhes experimentais adicionais são fornecidos no Exemplo 2.

15 A figura 13 provê o gráfico ROC para Muc-1 (MU) obtido com todas as amostras de pacientes. Detalhes experimentais adicionais são fornecidos no Exemplo 2.

A figura 14 provê o gráfico ROC para MMP-7 (MM) obtido com todas as amostras de pacientes. Detalhes experimentais adicionais são fornecidos no Exemplo 2.

20

Descrição detalhada da invenção

A presente invenção provê métodos de triagem e composições para identificar pacientes com câncer de ovário. Os métodos de triagem compreendem, genericamente, detectar a expressão de uma pluralidade de biomarcadores em uma amostra de corpo, particularmente uma amostra de sangue, mais particularmente uma amostra de soro, a partir da paciente. A superexpressão dos biomarcadores utilizados na prática da invenção é indicativa de uma probabilidade aumentada da presença de câncer de ovário. Em métodos de

25

30

5 triagem específicos da invenção, uma análise de duas etapas é utilizada para identificar pacientes com probabilidade aumentada de terem câncer de ovário. A primeira etapa de ensaio é executada para detectar a expressão de um primeiro biomarcador ou painel de biomarcadores em uma amostra de corpo de paciente. Se o primeiro biomarcador ou painel de biomarcadores for determinado como sendo superexpresso na amostra, uma segunda etapa de ensaio é executada para detectar a expressão de um segundo biomarcador ou painel de biomarcadores. A superexpressão dos primeiro e segundo biomarcadores ou painel de biomarcadores é indicativo de uma probabilidade aumentada de que a paciente tem câncer de ovário. Em certas modalidades, anticorpos são utilizados para detectar expressão de proteína de biomarcador. Em outros aspectos da invenção, quando a expressão de um painel de biomarcadores é detectada, a superexpressão de somente um subconjunto dos biomarcadores analisado pode ser suficiente para ser indicativo de maior probabilidade de a paciente ter câncer de ovário.

20 Embora a invenção não seja limitada a um mecanismo específico, a primeira etapa de ensaio é genericamente projetada para enriquecer a população de pacientes positivos-verdadeiros (isto é, em uma base de percentagem) por eliminar um grande número de negativos verdadeiros a partir de teste adicional. A primeira etapa de ensaio pode empregar uma sensibilidade e valor predizível negativo (NPV) mais elevados para obter o enriquecimento desejado da população de pacientes positivos-verdadeiros. A segunda etapa de ensaio é tipicamente destinada a eliminar aquelas
30 pacientes na população enriquecida que não têm atualmente

câncer de ovário, isto é, eliminar negativos verdadeiros adicionais a partir da população enriquecida. A segunda etapa de ensaio pode empregar um valor predizível positivo (PPV) e especificidade mais elevados, enquanto mantém uma
5 sensibilidade razoável, para eliminar adicionalmente negativos verdadeiros a partir da população enriquecida de pacientes positivos verdadeiros. Uma representação esquemática do teste de triagem de duas etapas e os resultados que podem ser obtidos com esse método são
10 fornecidos na figura 1.

Uma pessoa com conhecimentos na técnica reconhecerá que essas etapas de ensaio podem ser executadas como um teste de triagem único abrangendo as duas etapas de ensaio ou como dois testes distintos, onde cada teste abrange uma
15 das etapas de ensaio. Um biomarcador único ou painel de biomarcadores pode ser utilizado em cada etapa de ensaio para obter os valores desejados para sensibilidade, especificidade, NPV e PPV. Algoritmos podem ser desenvolvidos para selecionar biomarcadores específicos ou
20 combinações de biomarcadores para obter a sensibilidade, especificidade, NPV e PPV desejados para cada etapa de ensaio e o teste de triagem combinado compreendendo as duas etapas de ensaio.

Além da análise de duas etapas descrita acima, um
25 método de triagem para identificar pacientes com probabilidade aumentada de terem câncer de ovário compreende executar um método de triagem ou ensaio de "etapa única" ou "uma etapa" no qual a expressão de uma pluralidade de biomarcadores que são seletivamente
30 superexpressos em câncer de ovário é determinada em uma

amostra de corpo de paciente. A superexpressão de pelo menos um biomarcador(es) é indicativa de uma probabilidade aumentada da paciente ter câncer de ovário. Em aspectos específicos da invenção, o método de triagem de etapa única
5 ou uma etapa compreende detectar expressão de uma pluralidade de biomarcadores, incluindo, por exemplo, HE4, CA125, glicodelina, MMP-7, Muc-1, PAI-1, CTHRC1, inibina A, PLAU-4, prolactina, KLK-10, KLK-6, SLPI, e alfa-1 antitripsina, em uma amostra de corpo, onde a
10 superexpressão de pelo menos um, particularmente dois, mais particularmente três, dos biomarcadores é indicativa de probabilidade aumentada de ter câncer de ovário. Em modalidades específicas do método de triagem de etapa única da invenção, expressão de glicodelina, HE4, e CA125 é
15 determinada e superexpressão de pelo menos um, dois ou três dos biomarcadores é indicativa de uma probabilidade aumentada de ter câncer de ovário. Vide, por exemplo, a Tabela 54 e Exemplo experimental 4. Uma pessoa versada na técnica reconhecerá que ao contrário do método de triagem
20 de duas etapas descrito acima, o ensaio de triagem de etapa única não requer desempenho de uma primeira etapa de ensaio para detectar superexpressão de um biomarcador específico ou painel de biomarcadores seguido por uma segunda etapa de ensaio para determinar se um segundo biomarcador ou painel
25 de biomarcadores também é superexpresso para identificar uma paciente com probabilidade aumentada de ter câncer de ovário. Como tal, uma primeira etapa de ensaio para enriquecer a população para pacientes "positivas-verdadeiras" e uma segunda etapa de ensaio para eliminar
30 aquelas pacientes da população enriquecida que não têm

efetivamente câncer de ovário ("positivas salas") não é exigido no método de triagem de etapa única descrito aqui.

O nível de expressão de um biomarcador específico que é suficiente para constituir "superexpressão" variará dependendo do biomarcador específico utilizado. Em modalidades específicas da invenção, um "nível limite" de expressão é estabelecido para um biomarcador específico, onde níveis de expressão acima desse valor são considerados superexpressão. Uma variedade de métodos estatísticos e matemáticos para estabelecer o nível de limite de expressão é conhecida na técnica. Um nível de expressão de limite para um biomarcador específico pode ser selecionado, por exemplo, com base em dados a partir dos gráficos de Característica operacional de Receptor (ROC), como descrito nos Exemplos 2 e 3, ou em compilações de dados a partir de amostras de pacientes normais (isto é, uma população de pacientes normais). Por exemplo, o nível de expressão de limite pode ser estabelecido no nível de expressão médio mais duas vezes o desvio padrão, com base em análise de amostras a partir de pacientes normais não afligidas com câncer de ovário. Uma pessoa versada na técnica reconhecerá que esses níveis de expressão de limite podem variar, por exemplo, movendo ao longo do gráfico ROC para um biomarcador específico, para obter valores diferentes para sensibilidade, especificidade, valor predizível positivo (PPV), e valor predizível negativo (NPV), desse modo afetando o desempenho geral do ensaio.

Uma paciente que é identificada como tendo probabilidade aumentada de ter câncer de ovário, de acordo com os métodos revelados, pode ser submetida ao teste de

diagnóstico adicional para determinar, definitivamente, se a paciente tem câncer de ovário. "Teste de diagnóstico adicional" inclui, porém não é limitado a exame pélvico, ultra-som transvaginal, varredura CT, MRI, laparotomia, laparoscopia e biópsia. Tais métodos de diagnóstico são bem conhecidos na técnica. Além disso, pacientes classificadas como tendo probabilidade aumentada de terem câncer de ovário que são determinadas por teste de diagnóstico adicional não têm atualmente câncer de ovário podem ser estreitamente monitoradas em uma base regular para o desenvolvimento de câncer de ovário. A monitoração de tais pacientes pode incluir, porém não é limitada a, exame pélvico periódico, ultra-som transvaginal, varredura CT e MRI. Um médico com conhecimentos comuns na técnica reconhecerá técnicas apropriadas para monitorar pacientes em relação ao desenvolvimento de câncer de ovário. Por identificar e monitorar pacientes com probabilidade aumentada de ter câncer de ovário, os métodos de triagem da invenção podem permitir a detecção de câncer de ovário em um estágio inicial da doença, particularmente Estágio 1 ou Estágio 2, quando prognóstico e resultado da doença são muito aperfeiçoados.

Em modalidades específicas, anticorpos são utilizados para detectar expressão de biomarcador no nível de proteína. Em outros aspectos da invenção, a expressão de biomarcador é detectada no nível de ácido nucléico. Kits para pôr em prática os métodos de triagem da invenção, incluindo o método de triagem de duas etapas, são adicionalmente fornecidos.

Por "câncer de ovário" se quer dizer aquelas

condições classificadas por laparotomia pós-exploratória como patologia pré-maligna, patologia maligna, e câncer (FIGO estágios 1-4). Apresentação e classificação de câncer de ovário são descritas em detalhe acima. "Câncer de ovário em estágio inicial" se refere àqueles estados da doença 5 classificados como carcinoma estágio 1 ou estágio 2. A detecção prematura de câncer de ovário aumenta significativamente as taxas de sobrevivência de 5 anos. O termo "método de triagem" se refere a estratégias para 10 identificar pacientes que têm probabilidade aumentada de terem câncer de ovário de modo que tais pacientes podem ser selecionadas para métodos de diagnóstico, mais agressivos, para determinar definitivamente se as pacientes têm câncer de ovário. Os "métodos de triagem" ou "métodos de triagem de diagnóstico" da invenção não são genericamente 15 destinados a diagnosticar definitivamente uma paciente como tendo ou não câncer de ovário. Em vez disso, tais métodos são destinados a identificar mulheres tendo probabilidade aumentada de terem câncer de ovário de modo que essas 20 mulheres podem ser definitivamente diagnosticadas utilizando outros métodos (por exemplo, exame pélvico, ultra-som transvaginal, varredura CT, MRI, laparotomia, laparoscopia, e biópsia de amostras de tecido). Os regimes também podem ser instituídos para monitorar pacientes 25 identificadas como tendo probabilidade aumentada de terem câncer de ovário pelos presentes métodos, porém, que são determinadas como não tendo atualmente a doença.

Os métodos de triagem da invenção podem ser executados em uma base de caso a caso ou como um teste de 30 triagem de rotina periódica para a população do sexo

feminino em geral. Em algumas modalidades, os métodos de triagem para identificar pacientes com probabilidade aumentada de terem câncer de ovário podem ser vistos como comparáveis com esfregaços Pap para a identificação de
5 pacientes com probabilidade aumentada de terem câncer cervical. Como utilizado aqui, "identificar pacientes com probabilidade aumentada de terem câncer de ovário" são métodos pretendidos para detectar aquelas mulheres que são mais prováveis de terem câncer de ovário. Uma
10 "probabilidade aumentada de ter câncer de ovário" pretende significar aquelas pacientes que são determinadas de acordo com os presentes métodos a apresentar superexpressão de biomarcadores específicos são mais prováveis de terem câncer de ovário do que aquelas pacientes que não
15 apresentam.

"Diagnosticar câncer de ovário" pretende incluir, por exemplo, diagnosticar ou detectar a presença de câncer de ovário, monitorar a progressão da doença, e identificar ou detectar células ou amostras que são indicativas de câncer
20 de ovário. Os termos diagnosticar, detectar e identificar câncer de ovário são utilizados de forma intercambiável aqui. O diagnóstico definitivo de câncer de ovário compreenderá genericamente executar uma biópsia em uma amostra de tecido a partir da paciente.

25 Os métodos da presente invenção permitem determinação superior da probabilidade de se ter câncer de ovário quando comparado com métodos de triagem propostos atualmente conhecidos na técnica (por exemplo, medição de níveis CA125). Como utilizado aqui, "especificidade" se refere ao
30 nível no qual um método da invenção pode identificar

precisamente amostras que foram confirmadas como não malignas por laparotomia exploratória (isto é, negativos verdadeiros). Isto é, especificidade é a proporção de negativos da doença que são negativos em teste. Em um estudo clínico, a especificidade é calculada por dividir o número de negativos verdadeiros pela soma de negativos verdadeiros e positivos falsos. Por "sensibilidade" se quer dizer o nível no qual um método da invenção pode identificar precisamente amostras que foram confirmadas por laparotomia como positivas para câncer de ovário (isto é, positivos verdadeiros). Desse modo, a sensibilidade é a proporção de positivos da doença que são positivos em teste. A sensibilidade é calculada em um estudo clínico dividindo o número de positivos verdadeiros pela soma de positivos verdadeiros e negativos falsos. A sensibilidade dos métodos revelados para a detecção de câncer de ovário é pelo menos aproximadamente 70%, particularmente pelo menos aproximadamente 80%, mais particularmente pelo menos aproximadamente 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% ou mais. Além disso, a especificidade dos presentes métodos é pelo menos aproximadamente 70%, particularmente pelo menos aproximadamente 80%, mais particularmente pelo menos aproximadamente 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% ou mais.

O termo "valor predizível positivo" ou "PPV" se refere à percentagem de pacientes com um resultado de teste positivo nos métodos da invenção que têm efetivamente câncer de ovário. PPV é calculado em um estudo clínico dividindo o número de positivos verdadeiros pela soma de positivos verdadeiros e positivos falsos. PPV é altamente

dependente das taxas de prevalência para uma doença ou condição específica e mudará acentuadamente como resultado de diferenças em prevalência de doença. Portanto, com doenças de baixa prevalência, como câncer de ovário, testes de triagem com PPV relativamente baixo têm ainda utilidade clínica significativa. Ao contrário, uma doença com taxas de prevalência elevada exigiria um PPV mais elevado para ser clinicamente útil. Vide, por exemplo, Skates e outros (2004) J. Clin. Oncol. 22:4059-4066; Bast e outros (2005) Int. J. Gynecol. Cancer 15:274-281; Rosen e outros (2005) Gyn. Oncol. 99:267-277; e Pepe (2004) The Statistical evaluation of Medical testes for Classification and Prediction (Oxford University Press), todos os quais são aqui incorporados a título de referência na íntegra. O PPV para os presentes métodos de identificar pacientes com probabilidade aumentada de terem câncer de ovário é genericamente pelo menos aproximadamente 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30% ou mais. Em algumas modalidades, o PPV de um método da invenção é pelo menos aproximadamente 10%. Um PPV de pelo menos aproximadamente 10% para um método de triagem de diagnóstico é considerado na técnica como sendo de utilidade clínica. Vide Skates, e outros, acima. O "valor predizível negativo" ou "NPV" de um teste é a percentagem de pacientes com um resultado de teste negativo que na realidade não têm câncer de ovário. NPV é calculado em um estudo clínico dividindo o número de negativos verdadeiros pela soma de negativos verdadeiros e negativos falsos. O NPV para os presentes métodos de identificar pacientes com probabilidade aumentada de terem câncer de ovário é genericamente pelo menos aproximadamente 80%,

particularmente pelo menos aproximadamente 90%, mais particularmente pelo menos aproximadamente 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4, 99,5, 99,6, 99,7, 99,8, 99,9% ou mais. Em algumas modalidades, o NPV de um método da invenção é pelo menos aproximadamente 99%. Uma pessoa versada na técnica reconhecerá que os valores de PPV e NPV para os métodos da invenção se baseiam em uma população ajustada em prevalência e refletem as taxas de prevalência de câncer de ovário na população feminina dos EUA.

Um "biomarcador" é qualquer gene ou proteína cujo nível de expressão em um tecido ou célula seja alterado em comparação com aquele de uma célula ou tecido normal ou saudável. Biomarcadores da invenção são seletivos para câncer de ovário. Por "seletivamente superexpresso em câncer de ovário" se quer dizer que o biomarcador de interesse é superexpresso em câncer de ovário porém não é superexpresso em condições classificadas como não malignas, benignas e outras condições que não são consideradas como sendo doença clínica. Desse modo, a detecção dos biomarcadores da invenção permite a diferenciação de amostras indicativas de uma probabilidade aumentada de ter câncer de ovário ou a presença de câncer de ovário a partir de amostras normais (isto é, amostras a partir de pacientes que não têm câncer de ovário) e amostras que são indicativas de proliferação benigna e não maligna. Biomarcadores da invenção podem ser mencionados aqui de forma intercambiável como "biomarcadores de câncer de ovário," "marcadores" ou "marcadores de câncer de ovário."

Os biomarcadores da invenção incluem genes e

proteínas. Tais biomarcadores incluem DNA que compreende a
seqüência total ou parcial da seqüência de ácido nucléico
codificando o biomarcador, ou o complemento de tal
seqüência. Os ácidos nucléicos de biomarcador também
5 incluem RNA que compreende a seqüência inteira ou parcial
de qualquer uma das seqüências de ácido nucléico de
interesse. Uma proteína de biomarcador é uma proteína
codificada por ou correspondendo a um biomarcador de DNA da
invenção. Uma proteína de biomarcador compreende a
10 seqüência de aminoácido total ou parcial de qualquer uma
das proteínas ou polipeptídeos de biomarcador. Fragmentos e
variantes de genes e proteínas de biomarcador também são
abrangidos pela presente invenção. Por "fragmento" se quer
dizer uma porção do polinucleotídeo ou uma porção da
15 seqüência de aminoácido e conseqüentemente proteína
codificada desse modo. Polinucleotídeos que são fragmentos
de uma seqüência de nucleotídeo de biomarcador compreendem
genericamente pelo menos 10, 15, 20, 50, 75, 100, 150, 200,
250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 800, 900,
20 1,000, 1,100, 1,200, 1,300 ou 1,400 nucleotídeos contínuos,
ou até o número de nucleotídeos presentes em um
polinucleotídeo de biomarcador de comprimento total
revelado aqui. Um fragmento ou um polinucleotídeo de
biomarcador codificará genericamente pelo menos 15, 25, 30,
25 50, 100, 150, 200 ou 250 aminoácidos contínuos, ou até o
número total de aminoácidos presentes em uma proteína de
biomarcador de comprimento total da invenção. "Variante"
pretende significar seqüências substancialmente similares.
Genericamente, variantes de um biomarcador específico da
30 invenção terão pelo menos aproximadamente 40%, 45%, 50%,

55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou mais identidade de sequência com aquele biomarcador como determinado por programas de alinhamento de sequência.

5 Os biomarcadores da invenção incluem qualquer gene ou proteína que é seletivamente superexpresso em câncer de ovário, como definido acima, e podem compreender biomarcadores conhecidos bem como aqueles atualmente desconhecidos na técnica. Em modalidades específicas

10 biomarcadores são proteínas secretadas ou proteínas que são preditas como codificando proteínas membranosas com segmentos de transmembrana e domínios extracelulares. Biomarcadores de interesse incluem HE4, CA125, glicodelina, MMP-7, Muc-1, PAI-1, CTHRC1, inibina A, PLAU-4, prolactina,

15 KLK-10, KLK-6, e SLPI, alfa-1 antitripsina (AAT), Imp-2, FLJ10546, FLJ23499, MGC13057, SPON1, S100A1, SLC39A4, TACSTD2, MBG2, HETKL27 (MAL2), Cox-1, proteína cinase C-iota, caderina-6, ADPRT, matriptase, receptor de folato, claudina 4, mesotelina, aquaporina 5, cofilina 1,

20 gelsolina, clusterina, alfa tetranectina, vitronectina, proteína de plasma associada à gravidez-A (PAPP-A), e folistatina. Biomarcadores de interesse específico incluem, porém não são limitados a HE4, CA125, glicodelina, MMP-7, Muc-1, PAI-1, CTHRC1, inibina A, PLAU-4, prolactina, KLK-

25 10, KLK-6, SLPI, e alfa-1 antitripsina (AAT). Biomarcadores de maior interesse específico incluem HE4, glicodelina, MMP-7, SLPI, PLAU-R, Muc-1, inibina A e PAI-1.

HE4 é uma proteína que foi primeiramente observada em tecido epidídimo humano, e o nome "HE4" é uma abreviatura

30 de "Proteína Epidídima humana 4". Estudos subsequentes

mostraram que a proteína HE4 também está presente no trato reprodutivo feminino e outros tecidos epiteliais. O gene HE4 reside em cromossomo humano 20q12-13,1, verificou-se que a região de cromossomo 20q12 é freqüentemente
5 amplificada em carcinomas de ovário. Os estudos mostraram que HE4 é expresso por células de carcinoma de ovário. A proteína é N-glicosilada e é secretada extracelularmente. Vide, por exemplo, Drapin e outros (2005) Cancer Research 65(6): 2162-9; Hellstrom e outros (2003) Cancer Research
10 63: 3695-3700; e Bingle e outros (2002) Oncogene 21: 2768-2773.

CA-125 é uma glicoproteína de superfície de célula com elevado peso molecular detectada no soro de uma grande proporção de pacientes com câncer epitelial de ovário
15 (OEC). Entretanto, embora a percentagem seja elevada (75-90%) em estágios avançados dessa doença, é somente elevado em 50% dos pacientes com a doença no Estágio 1.0 uso de CA-125 como marcador para OEC é problemático porque a molécula também é expressa em um número de condições normais e
20 patológicas incluindo menstruação, gravidez, endometriose, doenças inflamatórias e outros tipos de câncer. A sensibilidade e especificidade aperfeiçoadas para OEC foram reportadas entre mulheres pós-menopausa. Vide, por exemplo, Bast e outros (1998) Int'l J. Biological Markers,
25 13:170-187; e Moss e outros (2005) J. Clin. Pathol. 58:308-312.

Glicodelina é um membro da superfamília de lipocalina com várias ações distintas em reconhecimento e diferenciação de células principalmente no eixo
30 reprodutivo. Anteriormente, essa glicoproteína foi

denominada proteína endometrial associada à progesterona (PAEP) e proteína placentária 14 (PP-14). A mudança de nome foi em parte iniciada porque glicodelina não é sintetizada pelo endométrio ou placenta. Glicodelina foi purificada a
5 partir de fluido amniótico como molécula 28kDa em géis SDS e reportada como sendo sintetizada pelo ovário normal e por tumores malignos de ovário. Sua presença foi reportada em soro. Vide, genericamente, Seppala e outros (2002) Endocrine Reviews 23:401-430; Pala e outros (1997) J.
10 Chromatography B 704:25-34; Meirit Kamarainen e outros (1996) Amer. J. Pathology 148: 1435-1443.

As proteínas da família de metaloproteinase de matriz (MMP) estão envolvidas na ruptura de matriz extracelular em processos fisiológicos normais, como desenvolvimento
15 embriônico, reprodução, e remodelagem de tecido, bem como em processos de doença, como artrite e metástase. A maioria das MMPs é secretada como proproteínas inativas que são ativadas quando clivadas por proteinases extracelulares. A enzima codificada pelo gene MMP-7 (matrilisina) degrada
20 proteoglicanos, fibronectina, elastina e caseína e difere da maioria dos membros da família de MMP em que não tem um domínio de proteína terminal-C conservado. A enzima está envolvida em cicatrização de ferimento, e estudos em camundongos sugerem que regula a atividade de defensinas em
25 mucosa intestinal. O gene MMP-7 faz parte de um cluster de genes de MMP que se localizam no cromossomo 11q22,3. MMP-7 é expresso em células epiteliais de tecido normal e doente. É conhecido como sendo expresso em tumores da mama, cólon e próstata, entre outros. É abundante em células de carcinoma
30 de ovário, porém não detectável por IHC em tecido epitelial

de ovário normal.

Muc-1 (mucin1, EMA, PEM, epsialin) é uma glicoproteína de mucina de superfície de célula grande expressa pela maioria das células epiteliais glandular e de duto e algumas linhagens de células hematopoiéticas. Funcionalmente, acredita-se que Muc-1 esteja envolvido com proteção e lubrificação de células, e possa desempenhar um papel em aderência de células, e/ou sinalização de células. O gene Muc-1 contém sete éxons e produz diversas variantes alternativamente fixadas, diferentes. A principal forma expressão de Muc-1 utiliza todos os sete éxons e é uma proteína de transmembrana do tipo 1 com um grande domínio de repetição tandem extracelular. O domínio de repetição tandem é altamente O-glicosilado e alterações em glicosilação foram mostradas em células epiteliais de câncer. Verificou-se que muc-1 é elevado em muitos tipos de câncer, mais notadamente com câncer avançado de mama. Ser independente como um marcador baseado em soro, teria pouca especificidade, porém poderia ser utilizado como meio auxiliar de prognóstico, em combinação com outros marcadores mais específicos.

PAI-1 (isto é inibidor ativador de plasminogênio tipo 1) é um inibidor de proteinase de serina ou cisteína. O mRNA de PAI-1 tem 2876 bp de comprimento, e a proteína codificada tem 402 aminoácidos de comprimento. O peso molecular calculado é 42,769 Da, ao passo que a proteína purificada por afinidade é reportada como sendo aproximadamente 50,000 Da, como determinado por eletroforese de gel SDS. PAI-1 desempenha um papel na inibição de degradação de matriz extracelular por PLAU e é

um gene alvo c-Myc não regulado putativo. PAI-1 também desempenha um papel chave no controle de coagulação e remodelagem de tecido. PAI-1 limita a produção de plasmina e serve para manter fibrinólise em verificação. Algumas
5 funções fisiológicas envolvendo a inibição de plasmina por PAI-1 incluem ovulação, migração de células e diferenciação de células epiteliais. Níveis elevados de PAI-1 em câncer indicam prognóstico ruim para sobrevivência de muitos cânceres humanos, incluindo cânceres de mama e pulmão.
10 Pappot e outros (29 de novembro de 2005) Lung Cancer [Epub antes da impressão]; Chazaud e outros (2002) American Journal of Pathology 160:237-246.

Repetição hélice tripla de colágeno contendo 1 (CTHRC1) foi identificada em uma triagem para seqüências
15 diferencialmente expressas em artérias com lesão por balão versus normais. Em estudos por Pyagay e outros, a expressão de CTHRC1 não foi detectável em artérias normais. Entretanto, em lesão foi expressa de forma transiente por fibroblastos da adventícia de remodelagem e por células de
20 músculo liso da neoíntima. Foi encontrada também na matriz de placas ateroscleróticas humanas em calcificação. CTHRC1 é uma proteína de 28 kDa secretada que é glicosilada e altamente conservada a partir de cordados inferiores para mamíferos. Um motivo de colágeno curto com 12 repetições de
25 Gly-X-Y parece ser responsável por trimerização da proteína e isso torna a molécula suscetível à clivagem por colidadenase. Níveis de expressão de mRNA Cthrc1 são aumentados em resposta à transformação do fator de crescimento-beta e proteína morfogenética de osso-4.
30 Ensaaios de migração de células executados com fibroblastos

de superexpressão de CTHRC1 e células de músculo liso demonstram que níveis aumentados de CTHRC1 são associados à capacidade migratória aumentada. Adicionalmente, a superexpressão de CTHRC1 causou uma redução dramática em níveis de proteína e mRNA de colágeno tipo I. Os dados de Pyagay e outros indicam que CTHRC1 de molécula novo é expresso de forma transiente na parede arterial em resposta à lesão onde pode contribuir para remodelagem vascular limitando o depósito de matriz de colágeno e a promoção de migração de células. Pyagay e outros (2005) Circ. Res. 96(2): 261-8.

Inibinas são hormônios de proteína que pertencem à superfamília de fator de crescimento β em transformação e são heterodímeros consistindo em subunidades α e β unidas por ligações de dissulfeto. As 2 formas de inibinas (isto é, A e B) diferem no tipo de subunidade β (isto é, βA ou βB) ligada à subunidade α . Em mulheres na idade reprodutiva, inibinas são conhecidas por serem secretadas por células granulosa do ovário e circulam no sangue. Inibinas variam em concentração através do ciclo menstrual e durante gravidez, e causam impacto na produção de FSH pituitária, gametogênese e eventos gestacionais. Em mulheres pós-menopausa inibinas caem a níveis muito baixos. Publicações recentes indicam que inibinas são marcadores de diagnóstico para câncer de ovário. Vide, por exemplo, Robertson e outros (2002) Mol. Cell Endocrinol. 191:97-103; El-Shalakany e outros (2004) J. Obstet. Gynaecol. Res. 30: 155-161.

Receptor de urocinase ativador de plasminogênio (PLAU-R ou UPAR) é uma glicoproteína de superfície de

célula com um peso molecular de aproximadamente 60 kDa que é ligado por sua extremidade terminal-carbóxi à membrana de célula por ligação de GPI. PLAU-R serve como um receptor específico para o ativador de plasminogênio de urocinase
5 protease serina (uPA) que está envolvido em remodelagem de matriz extracelular/membrana de base em processos tanto normais quanto patológicos. PLAU-R solúvel, liberado a partir da superfície da célula foi reportado como estando em concentrações elevadas em soro em vários tipos de câncer
10 humano incluindo câncer colo-retal, de mama e de ovário. Vide, por exemplo, Sier e outros, (1998), Cancer res 58:1843-1849; e Begum e outros (2004) Anticancer Research 24:1981-1986.

Prolactina é um hormônio de proteína de 23 kDa de 198
15 aminoácidos secretado em quantidades significativas pela glândula pituitária anterior. Em combinação com estrógeno, prolactina desempenha um papel importante na iniciação de crescimento de glândula mamária e em lactação. Além disso, considera-se que prolactina tenha um papel significativo em
20 crescimento de células e função imune. Um relatório recente utilizando um kit ELISA comercialmente disponível reportou que níveis de prolactina em soro foram significativamente elevados em câncer de ovário. Vide, genericamente, Mor e outros (2005) Proc. Natl. Acad. Sci. 102: 7677-7682.

25 Calicreínas constituem um subgrupo de protease de serina tendo funções fisiológicas diversas. São agrupados como um grupo em cromossomo 19q13. Evidência crescente sugere que muitas calicreínas estão envolvidas em carcinogênese e algumas têm potencial com novos
30 biomarcadores de câncer e outras doenças.

KLK-6 é um dos quinze membros da subfamília de calicreína localizados em um cluster no cromossomo 19. A enzima codificada é regulada por hormônios de esteróide. Em cultura de tecido, verificou-se que a enzima gera
5 fragmentos amiloidogênicos a partir da proteína precursora de amilóide, sugerindo um potencial para envolvimento em doença de Alzheimer. KLK-6 foi verificada como uma proteína secretada, e descoberta como estando elevada em pacientes com câncer de ovário. Desse modo, foi levantada a hipótese
10 como tendo valor como um marcador sorológico para essa doença.

O gene de calicreína 10 humano (KLK10, também conhecido como gene 1 específico de célula epitelial normal (NES-1)) é um membro da família de gene de calicreína. O
15 produto de gene é uma protease de serina secretada cuja concentração em vários fluidos biológicos é conhecida como sendo alterada em alguns estados de doença. Em particular, KLK10 é expresso em células epiteliais do ovário e essa expressão foi reportada como sendo elevada em soro de
20 pacientes com câncer de ovário. Desse modo, KLK10 pode servir como um biomarcador de soro para câncer de ovário. Vide, por exemplo, Liu-Ying e outros (2003) Cancer Res. 63:807-811; Yousef e Diamandis (2003) Thromb Haemost. 90:7-16.

25 Inibidor de Protease de leucócito secretor (SLPI) é uma proteína que foi primeiramente isolada em secreções de glândula parótida humana. Estudos subsequêntes mostraram que a proteína SLPI também está presente em saliva e numerosas superfícies de mucosa como aquelas do pulmão,
30 passagens nasais, cérvix e vesículas seminais.

Acredita-se que SLPI atue como uma defesa contra doenças crônicas do pulmão porque é um inibidor potente de elastase de neutrófilo, cuja presença é aumentada em doenças inflamatórias crônicas do pulmão e que podem
5 destruir muitos dos componentes do tecido do pulmão. SLPI também inibe a liberação de histamina a partir de mastócitos, de modo que também é ativo na resposta alérgica. Também se pensa que a proteção de membranas fetais e tecido cervical seja uma função de SLPI.

10 Verificou-se que o gene que codifica a proteína de SLPI é supra-regulada em câncer do ovário, e uma diferença significativa foi encontrada entre os níveis elevados de SLPI no soro de pacientes com câncer maligno do ovário ao contrário dos níveis encontrados em pacientes com cistos
15 benignos do ovário ou pacientes normais. A proteína de SLPI tem uma massa de 12 kDa, é não glicosilado, hidrofóbico e catiônico. Vide genericamente Hollander e outros (2003) Cancer Cell International 3:14, Helmig e outros (1995) Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Bio. 59(1):95-101; Hough e
20 outros (2001) Cancer Research 61: 3869-3876; e Tsukishiro e outros (2005) Gynecologic Oncology 96: 516-519.

Alfa-1 antitripsina (AAT) é uma proteína de fase aguda sintetizada pelo fígado e o inibidor de soro principal de enzimas proteolíticas como tripsina,
25 quimotripsina, plasmina e trombina. Em uma reação inflamatória a concentração de soro de AAT pode ser elevada em tanto quanto 3-4 vezes. A molécula existe como um número de variantes genéticas com um peso molecular de monômero de 40-50 kDa. A concentração de soro normal média (mg/ml) foi
30 reportada como sendo $2,21 \pm 0,35$ e $2,14 \pm 0,37$. O interesse

em AAT como biomarcador de câncer de ovário resultou a partir de um estudo spec. De massa/eletroforese de gel 2D interno que indicou que AAT era elevado no soro de pacientes com câncer de ovário. Vide, por exemplo, Song e
5 outros (1994) J. Affect. Disorders 30:283-288; Ledue e outros (1993) Clin. Chim. Acta. 223: 73-28.

Embora os biomarcadores acima tenham sido discutidos em detalhe, qualquer biomarcador cuja superexpressão seja seletiva para câncer de ovário pode ser utilizado para pôr
10 em prática a invenção, incluindo biomarcadores conhecidos na técnica e aqueles não identificados acima. Tais biomarcadores incluem genes e proteínas que são, por exemplo, envolvidos em defeitos em controle de ciclo de célula/replicação de DNA, crescimento e proliferação de
15 células, escapamento de apoptose, angiogênese ou linfogênese, ou os mecanismos de motilidade e invasão de células de câncer.

De interesse específico são biomarcadores que são seletivamente superexpressos em câncer de ovário no estágio
20 inicial. Por "seletivamente superexpresso em câncer de ovário no estágio inicial" se quer dizer que o biomarcador de interesse é superexpresso em estados de câncer de ovário estágio 1 ou estágio 2 porém não é superexpresso em amostras normais ou em condições classificadas como não
25 malignas, benignas e outras condições que não devem ser consideradas como sendo doença clínica. Uma pessoa versada na técnica reconhecerá que biomarcadores de câncer de ovário no estágio inicial incluem aqueles genes e proteínas específicos para câncer de ovário que são inicialmente
30 superexpressos em estágio 1 ou estágio 2 e cuja

superexpressão persiste durante todos os estágios avançados da doença, bem como biomarcadores que são somente superexpressos em câncer de ovário estágio 1 ou estágio 2. A detecção de expressão de biomarcadores que são seletivamente superexpressos em câncer de ovário no estágio inicial pode permitir a detecção e diagnóstico mais cedo de câncer de ovário e, por conseguinte, melhorar o prognóstico do paciente.

Os métodos da invenção compreendem detectar a expressão de uma pluralidade de biomarcadores. Como utilizado aqui, uma "pluralidade" de biomarcadores se refere a 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou mais biomarcadores. Em particular, quando o método de triagem de duas etapas da invenção é utilizado para identificar pacientes com probabilidade aumentada de terem câncer de ovário, uma pluralidade de biomarcadores pode se referir à detecção de pelo menos um biomarcador durante a primeira etapa de ensaio e pelo menos um biomarcador adicional durante a segunda etapa de ensaio. Uma pessoa versada na técnica também reconhecerá que um painel de biomarcadores pode ser utilizado para identificar pacientes com probabilidade aumentada de terem câncer de ovário de acordo com os presentes métodos. Um painel de biomarcadores pode compreender qualquer número ou combinação de biomarcadores de interesse. Em algumas modalidades, um painel compreendendo uma pluralidade de biomarcadores selecionados a partir do grupo que consiste em HE4, CA125, glicodelina, MMP-7, Muc-1, PAI-1, CTHRC1, inibina, PLAU-R, prolactina, KLK-10, KLK-6, e SLPI, alfa-1 antitripsina (AAT). Em outras modalidades, é fornecido um painel de biomarcadores

selecionado do subconjunto de biomarcadores compreendendo CA125, HE4, glicodelina, MMP-7, SLPI, PLAU-R, Muc-1, inibina A, e PAI-1.

Qualquer paciente mulher ou população de pacientes
5 pode ser avaliada utilizando os métodos de triagem e diagnóstico da invenção. Por exemplo, os métodos revelados aqui podem ser executados na população de pacientes mulheres em geral, bem como na população mais estreita de mulheres pós-menopausa. O termo "pós-menopausa" é entendido
10 por aqueles versados na técnica. Em modalidades específicas, pós-menopausa se refere genericamente a, por exemplo, mulheres acima de 55 anos de idade. Em modalidades particulares, os métodos de triagem são executados rotineiramente (por exemplo, anualmente, a cada dois anos, etc.)
15 na população feminina em geral. A triagem regular de pacientes pode iniciar, por exemplo, no início da menstruação, na idade de 30, ou no início da menopausa. A triagem da população de pacientes de alto risco, como definido abaixo, será tipicamente executada em uma base de
20 rotina independente da idade da paciente. Pacientes que são tanto assintomáticas como sintomáticas (isto é, apresentando sintomas característicos de câncer de ovário, como dor ou inchaço abdominal ou pélvico) podem ser avaliados em relação a uma probabilidade aumentada de terem
25 câncer do ovário utilizando os métodos de triagem e diagnóstico da invenção. Mulheres que estão com baixo risco de desenvolverem câncer do ovário e aquelas que são consideradas de alto risco com base em fatores de risco de histórico familiar e clínico também pode ser avaliadas
30 utilizando os presentes métodos. Pacientes consideradas de

"alto risco" com base em tais fatores de risco histórico de família e clínico incluem, porém não são limitadas a pacientes vivendo com câncer de mama, câncer de cólon, ou síndrome de ovário/mama, mulheres com um parente de primeiro grau com câncer de ovário (por exemplo, mãe, filha ou irmã), pacientes positivos para pelo menos um gene de câncer de mama (BRCA 1 ou 2), e mulheres que sofrem de HNPCC (isto é, câncer colo-retal não polipose Hereditário).

Em um aspecto da invenção, a população alvo para os métodos de triagem e diagnóstico é o grupo de pacientes assintomáticos, classificado como alto risco com base, por exemplo, nos fatores de risco familiares e clínicos acima referenciados. Essa população assintomática de alto risco representa mais de 8 milhões de mulheres nos Estados Unidos. É reconhecido que os métodos, composições e kits da invenção serão de utilidade específica para pacientes tendo risco aumentado de desenvolver cânceres de ovário e para seus médicos. Pacientes reconhecidas na técnica como tendo risco aumentado de desenvolver cânceres de ovário incluem, por exemplo, pacientes com histórico familiar de câncer de ovário e pacientes de idade em avanço (por exemplo, mulheres com mais de 55 anos de idade).

Um número de condições ou características clínicas não diretamente relacionadas a câncer de ovário pode existir nas populações de pacientes testadas de acordo com os métodos da invenção, desse modo interferindo nos resultados dos métodos de triagem e diagnóstico revelados aqui. Tais condições e características clínicas são mencionadas aqui como "patologias e substâncias interferentes" e incluem, porém não são limitadas a,

gravidez (primeiro trimestre), câncer de mama, hepatite crônica, câncer de cólon, terapia com contraceptivo oral, doença das artérias coronárias, trombose de veia profunda, diabetes, endometriose, terapia de reposição hormonal, 5 menstruação, mieloma múltiplo, doença policística/cisto no ovário, polimialgia, polimiosite, câncer retal, artrite reumatóide, eritematoso de lúpus sistêmico (SLE) e tratamento com warfarin. Patologias interferentes exemplares, adicionais incluem condições uterinas (por 10 exemplo, miomas, adenomiose e câncer endometrial), condições dos ovários (por exemplo, crescimentos benignos como cistos funcionais, cistos teca-luteína, luteoma de gravidez, ovários esclerocísticos, cistadenoma seroso, cistadenoma que contém mucina, teratoma cística, fibroma, 15 tecoma e tumor de Brenner; neoplasmas; e condições malignas como cistadenocarcinoma e adenocarcinoma), condições de tuba de Falópio (por exemplo, abscesso tubo-ovariano, hidrosaplinx, cisto parovariano, gravidez ectópica e câncer das tubas de Falópio), condições do intestino (por exemplo, 20 distensão com gás e/ou fezes, diverticulite, ileíte, apendicite e câncer de cólon) e outras condições diversas (por exemplo, bexiga distendida, rim pélvico, cisto uracal, hematoma de parede abdominal, abscesso de parede abdominal e neoplasmas retroperitoneais, como linfoma, sarcoma e 25 teratoma. Em modalidades específicas, os biomarcadores, níveis de expressão limite, e modelos matemáticos utilizados nos métodos de diagnóstico e triagem descritos aqui, serão selecionados de modo a minimizar os efeitos de substâncias e patologias interferentes sobre o desempenho 30 (isto é, a especificidade, sensibilidade, PPV e NPV) dos

métodos reivindicados.

Por "amostra do corpo" se quer dizer qualquer amostragem de células, tecidos ou fluidos corpóreos a partir de uma paciente na qual a expressão de um biomarcador possa ser detectada. Os exemplos de tais amostras do corpo incluem, porém não são limitadas ao sangue (por exemplo, sangue integral, soro de sangue, sangue tendo plaquetas removidas, etc.), linfa, fluidos ascíticos, urina, fluidos ginecológicos (por exemplo, secreção de ovário, falópio, e uterina, menstruação, etc.), biópsias, e fluidos obtidos durante laparoscopia. As amostras do corpo podem ser obtidas a partir de um paciente por uma variedade de técnicas incluindo, por exemplo, por venopuntura, por raspagem ou aplicação em uma área, ou pelo uso de uma agulha para aspirar fluidos corpóreos ou tecidos. Os métodos para coletar várias amostras de corpo são bem conhecidos na técnica. Em modalidades específicas, a amostra do corpo compreende sangue ou soro. Os presentes inventores reconheceram que os métodos para a coleta e armazenagem de amostras de sangue, mais particularmente amostras de soro, afetam o desempenho dos métodos revelados aqui. Vários estudos indicam que a amostra do corpo, particularmente amostra de soro, métodos de coleta e armazenagem são críticos para obter desempenho aceitável de ensaio. Vide, por exemplo, Diamandis (2004) J. Natl. Cancer Institute 95:353-356 e Thavasu e outros (1992) J. Immunol. Meth. 153: 115-124, que é aqui incorporado a título de referência na íntegra. Um método exemplar para coleta e armazenagem de soro é fornecido no Exemplo 1.

Quaisquer métodos disponíveis na técnica para a

detecção de expressão de biomarcador podem ser utilizados na prática da invenção. A expressão de um biomarcador da invenção pode ser detectada em um nível de ácido nucléico ou um nível de proteína. Para determinar superexpressão, a amostra do corpo a ser examinada pode ser comparada com uma amostra de corpo correspondente que se origina de uma pessoa saudável. Isto é, o nível "normal" de expressão é o nível de expressão do biomarcador em uma amostra de corpo a partir de uma paciente que não é afligida com câncer de ovário. Tal amostra pode estar presente em forma padronizada. Em algumas modalidades, a determinação da superexpressão de biomarcador não requer comparação entre a amostra do corpo e uma amostra do corpo correspondente que se origina de uma pessoa normal.

Qualquer biomarcador ou combinação de biomarcadores da invenção, bem como quaisquer biomarcadores de câncer de ovário conhecidos, podem ser utilizados nos métodos, composições e kits da presente invenção. Em geral, é preferível utilizar biomarcadores para os quais a diferença entre o nível de expressão do biomarcador em uma amostra do corpo a partir de uma paciente afligida com câncer de ovário e o nível de expressão do mesmo biomarcador em uma amostra de sangue "normal" (isto é, a partir de uma paciente livre de câncer no ovário) é tão grande quanto possível. Embora essa diferença possa ser tão pequena quanto o limite de detecção do método para determinar a expressão do biomarcador, prefere-se que a diferença seja pelo menos maior do que o erro padrão do método de avaliação, e de forma ótima uma diferença de pelo menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 vezes ou maior do que o

nível de expressão do mesmo biomarcador em uma amostra de corpo normal. O nível de expressão "normal" de um biomarcador da invenção pode ser determinado por avaliar expressão do biomarcador em uma amostra do corpo obtida a partir de uma paciente não afligida com câncer de ovário. Alternativamente, e particularmente à medida que informações adicionais se tornam disponíveis, como resultado do desempenho de rotina dos métodos descritos aqui, valores médios para níveis de expressão de biomarcador podem ser utilizados.

Como descrito acima, em alguns aspectos da invenção, um nível limite de expressão de um biomarcador específico, acima do qual o biomarcador é considerado como sendo superexpresso em uma amostra de paciente, pode ser estabelecido. Os métodos para selecionar o valor limite incluem, porém não são limitados à análise do gráfico ROC para o biomarcador ou análise do nível de expressão de biomarcador para uma população de pacientes normais. Os valores de "corte" ou limite exemplares incluem (1) o nível de expressão média mais duas vezes o desvio padrão, como determinado a partir de uma população de amostras de pacientes normais e (2) níveis de expressão selecionados a partir da curva ROC que representam o valor mais elevado de sensibilidade mais especificidade. O nível de expressão limite para um biomarcador específico pode ser determinado em relação ao nível de expressão em uma população de pacientes normais. Pessoas versadas na técnica reconhecerão que outros métodos para selecionar valores de expressão limite apropriados podem ser utilizados para pôr em prática a invenção.

Os métodos para detectar biomarcadores da invenção compreendem quaisquer métodos que determinam a quantidade ou a presença dos biomarcadores no nível de ácido nucléico ou de proteína. Tais métodos são bem conhecidos na técnica e incluem, porém não são limitados a western blots, northern blots, southern blots, ELISA, imunoprecipitação, imunofluorescência, citometria de fluxo, imunocitoquímica, imunoensaios baseados em conta multiplex, técnicas de hibridização de ácido nucléico, métodos de transcrição inversa de ácido nucléico e métodos de amplificação de ácido nucléico. Em modalidades específicas, a superexpressão de um biomarcador é detectada em um nível de proteína utilizando, por exemplo, anticorpos que são dirigidos contra proteínas de biomarcador específicas. Esses anticorpos podem ser utilizados em vários métodos como Western blot, ELISA, imunoensaio baseado em conta múltiplex, imunoprecipitação, ou técnicas de imunocitoquímica. Os ensaios baseados em conta múltiplex utilizados para pôr em prática a presente invenção incluem, porém não são limitados a, tecnologia Luminex descrita nas patentes US números 6,599,331, 6,592,822 e 6,268,222, todas as quais são incorporadas aqui a título de referência na íntegra. Em modalidades específicas, o sistema LabMAP® Luminex é utilizado, como descrito na publicação internacional número WO 2005/016126, que é incorporada aqui a título de referência na íntegra.

Em algumas modalidades da invenção, anticorpos específicos para proteínas de biomarcador são utilizados para detectar a expressão de uma pluralidade de proteínas de biomarcador em uma amostra de corpo para identificar

pacientes com probabilidade aumentada de terem câncer de ovário. O método compreende obter uma amostra de corpo a partir de uma paciente, particularmente uma amostra de soro, contatar a amostra de corpo com anticorpos dirigidos a uma pluralidade de biomarcadores que são seletivamente superexpressos em câncer de ovário, e detectar ligação de anticorpo para determinar se os biomarcadores são superexpressos na amostra da paciente. Nos métodos de triagem da invenção, superexpressão dos biomarcadores é indicativo de uma probabilidade aumentada de ter câncer de ovário. Pacientes classificadas pelos presentes métodos de triagem como tendo probabilidade aumentada de terem câncer de ovário são submetidas a teste de diagnóstico adicional para detectar a presença de câncer de ovário. Pacientes do sexo feminino, identificadas pelos presentes métodos de triagem para câncer de ovário que são determinadas como não sofrendo atualmente de câncer de ovário são regularmente monitoradas para detectar potencialmente câncer de ovário em um estágio mais cedo.

Como descrito acima, em aspectos específicos da invenção, os métodos de triagem para identificar pacientes com probabilidade aumentada de terem câncer de ovário podem compreender uma análise de duas etapas. Isto é, o método compreende executar uma primeira etapa de ensaio compreendendo detectar a expressão de um primeiro biomarcador ou um primeiro painel de biomarcadores em uma amostra de corpo e determinar se o primeiro biomarcador ou painel de biomarcadores é superexpresso. Se um resultado positivo for obtido na primeira etapa de ensaio (isto é, o primeiro biomarcador ou painel de biomarcadores é

superexpresso na amostra do corpo) o método compreende ainda executar uma segunda etapa de ensaio compreendendo detectar a expressão de um segundo biomarcador ou um segundo painel de biomarcadores e determinar se o segundo biomarcador ou painel de biomarcadores é superexpresso. A superexpressão tanto do primeiro quanto segundo biomarcador ou painéis de biomarcadores (isto é, um resultado positivo nas duas etapas de ensaio) é indicativa de uma probabilidade aumentada de ter câncer de ovário. Em modalidades específicas, a detecção de expressão dos biomarcadores nas primeira e segunda etapas de ensaio, é executada no nível de proteína e compreende contatar a amostra do corpo, mais particularmente uma amostra de soro, com anticorpos específicos para os biomarcadores específicos de interesse e detectar ligação de anticorpo. Em certos métodos, a expressão de proteína de biomarcador é detectada utilizando uma ELISA ou formato de imunoensaio baseado em conta multiplex.

Nos métodos de triagem de "duas etapas" da invenção, o biomarcador ou painel de biomarcadores utilizado na primeira etapa pode ser empregado para maximizar sensibilidade e NPV. Isto é, a primeira etapa da triagem pode ser projetada para maximizar o número de negativos verdadeiros classificados como negativos pelos métodos da invenção, desse modo eliminando uma percentagem significativa de negativos verdadeiros a partir da análise adicional. Portanto, a população de pacientes classificada como positiva pela primeira etapa de ensaio será enriquecida em pacientes positivos verdadeiros. A segunda etapa de triagem nos métodos de duas etapas pode ser

projetada para maximizar PPV e especificidade, enquanto mantém uma sensibilidade razoável, para identificar mulheres com probabilidade mais elevada de terem câncer de ovário. Especificidade, sensibilidade, valores de PPV e NPV
5 podem ser determinados para cada etapa individual de ensaio no método, como descrito acima. Quando um método de triagem de duas etapas é utilizado, sensibilidade, especificidade, valores de PPV e NPV combinados podem ser determinados para o método como um todo. Em modalidades específicas, o método
10 de duas etapas para identificar pacientes com probabilidade aumentada de terem câncer de ovário terá uma sensibilidade combinada de pelo menos 90%, uma especificidade combinada de pelo menos 98%, um PPV combinado de pelo menos 10%, e um NPV combinado de pelo menos 99,9%. Uma pessoa versada na
15 técnica reconhecerá ainda que embora os métodos de triagem de duas etapas tenham sido descritos em detalhe, métodos de triagem similares compreendendo 3, 4, 5 ou mais etapas de ensaio também são abrangidos pela presente invenção. Tais etapas de ensaio seguintes podem descartar outras doenças,
20 como condições cardiovasculares, da presença de câncer de ovário.

Em algumas modalidades da invenção, algoritmos ou modelos matemáticos podem ser aplicados para desenvolver "regras de teste" para determinar quando uma amostra de
25 paciente é "positiva" (isto é, indicativa de probabilidade aumentada de ter câncer de ovário). Por exemplo, quando a expressão de HE4, CA125, PLAU-R, glicodelina, Muc-1 e PAI-1 é detectada, o teste de triagem é considerado positivo se
(1) quaisquer três de HE4, CA125, glicodelina, PAI-1 e
30 PLAU-R forem positivos (isto é, superexpressos) ou se (2)

HE4 e CA125 forem ambos superexpressos; de outro modo, o teste é considerado negativo. Em um exemplo adicional, o teste é considerado positivo se (1) quaisquer três entre HE4, CA125, glicodelina, MMP-7 e PLAU-R forem positivos
5 (isto é, superexpressos) ou se (2) HE4 for superexpresso e também qualquer um entre CA125, glicodelina, MMP-7 ou PLAU-R for positivo; de outro modo, o teste é considerado negativo. Uma pessoa versada na técnica reconhecerá que várias das tais regras de teste podem ser desenvolvidas e
10 aplicadas nos presentes métodos para identificar pacientes com probabilidade aumentada de terem câncer de ovário como regressão logística. Outros modelos matemáticos que podem ser aplicados são descritos em Zhou e outros (2002) Statistical Methods in Diagnostic Medicine (Wiley, Nova
15 York), que é aqui incorporado a título de referência na íntegra.

Em outros aspectos da invenção, os métodos para diagnosticar câncer de ovário em uma paciente compreendem obter uma amostra de corpo a partir de uma paciente,
20 contatar a amostra do corpo com anticorpos dirigidos a uma pluralidade de biomarcadores que são seletivamente superexpressos em câncer de ovário, e detectar ligação de anticorpos para determinar se os biomarcadores são superexpressos na amostra da paciente. Nos métodos de
25 diagnóstico da invenção, a superexpressão dos biomarcadores é indicativa da presença de câncer de ovário.

Ainda em outras modalidades da invenção, são fornecidos métodos para avaliar a eficácia de uma terapia para tratar câncer de ovário em uma paciente. Tais métodos
30 compreendem, tipicamente, comparar o nível de expressão de

uma pluralidade de biomarcadores da invenção em uma primeira amostra de corpo de paciente obtida antes da iniciação de terapia com aquela a partir de uma segunda amostra obtida após administração de pelo menos uma porção da terapia. Um nível de expressão significativamente mais baixo dos biomarcadores na segunda amostra da paciente em relação àquele da primeira amostra obtida antes da iniciação da terapia é uma indicação positiva da eficácia da terapia para tratar câncer de ovário na paciente, ao passo que um nível de expressão significativamente mais elevado dos biomarcadores na segunda amostra é uma indicação negativa da eficácia da terapia. Como utilizado aqui, uma "indicação positiva da eficácia da terapia" significa que a terapia está produzindo resultados benéficos no tratamento de câncer de ovário (por exemplo, regressão de tumor, etc.). Uma "indicação negativa da eficácia da terapia" pretende significar que a terapia não está tendo efeitos benéficos com relação ao tratamento de câncer de ovário. Uma indicação negativa da eficácia do tratamento específico pode ser relacionada, por exemplo, à dosagem. Em dosagens mais elevadas, a terapia pode ser eficaz.

Uma pessoa versada na técnica reconhecerá que nesses métodos o termo "terapia" inclui qualquer terapia para tratar câncer de ovário, incluindo, porém, não limitado a quimioterapia, terapia de radiação, remoção cirúrgica do tecido do tumor, terapia de gene e terapia biológica. Os métodos da invenção podem ser utilizados para avaliar uma paciente antes, durante e após terapia para avaliar, por exemplo, uma redução em carga do tumor.

A invenção provê adicionalmente um método de monitoração para avaliar a regressão ou progressão de câncer de ovário em uma paciente compreendendo detectar em uma primeira amostra de paciente em um primeiro ponto de tempo o nível de expressão de uma pluralidade de biomarcadores da invenção, repetir essa análise com uma segunda amostra de paciente obtida em um ponto de tempo posterior, e comparar o nível de expressão dos biomarcadores nos dois pontos de tempo. Um nível de expressão significativamente mais elevado dos biomarcadores na amostra do corpo da paciente no ponto de tempo posterior indica que o câncer de ovário progrediu, ao passo que um nível de expressão significativamente mais baixo é uma indicação de que o câncer de ovário regrediu. Como utilizado aqui, "regressão de câncer de ovário" pretende significar que a condição da paciente com relação ao câncer de ovário melhorou, como caracterizado, por exemplo, pelo tamanho diminuído do tumor. "Progressão do câncer de ovário" significa que a condição da paciente com relação ao câncer de ovário piorou, como caracterizado, por exemplo, por tamanho aumentado de tumor, metástase, etc. Os significados dos termos "regressão" e "progressão" com relação aos estados de doença serão entendidos por aqueles versados na técnica.

Em certos aspectos da invenção, a expressão de biomarcador é detectada no nível de proteína utilizando anticorpos. Os termos "anticorpo" e "anticorpos" abrangem, em termos amplos, formas de ocorrência natural de anticorpos e anticorpos recombinantes como anticorpos de cadeia única, anticorpos quiméricos e humanizados e

anticorpos multi-específicos bem como fragmentos e derivados de tudo acima, cujos fragmentos e derivados têm pelo menos um sítio de ligação antigênico. Derivados de anticorpo podem compreender uma proteína ou fração química conjugada com o anticorpo.

"Anticorpos" e "imunoglobulinas" (Igs) são glicoproteínas tendo as mesmas características estruturais. Embora anticorpos apresentam especificidade de ligação a um antígeno, imunoglobulinas incluem tanto anticorpos como outras moléculas semelhantes a anticorpo que não têm especificidade de antígeno. Polipeptídeos do tipo mencionado por último são, por exemplo, produzidos em níveis baixos pelo sistema de linfa e em níveis aumentados por mielomas.

O termo "anticorpo" é utilizado no sentido mais amplo e abrange anticorpos totalmente montados, fragmentos de anticorpo que podem ligar antígeno (por exemplo, Fab', F'(ab)₂, Fv, anticorpos de cadeia única, diacorpos), e peptídeos recombinantes compreendendo o acima.

O termo "anticorpo monoclonal", como utilizado aqui, se refere a um anticorpo obtido a partir de uma população de anticorpos substancialmente homogêneos, isto é, os anticorpos individuais compreendendo a população são idênticos exceto por mutações de ocorrência natural, possíveis que podem estar presentes em quantidades menores.

"Fragmentos de anticorpo" compreendem uma porção de um anticorpo intacto, preferivelmente a região variável ou de ligação de antígeno do anticorpo intacto. Os exemplos de fragmentos de anticorpo incluem Fab, Fab', F(ab')₂, e fragmentos Fv; diacorpos; anticorpos lineares (Zapata e

outros (1995) Protein Eng. 8 (10): 1057-1062); moléculas de anticorpo de cadeia única; e anticorpos multi-específicos formados a partir de fragmentos de anticorpo. Digestão de papaína de anticorpos produz dois fragmentos de ligação de antígeno idênticos, denominados fragmentos "Fab", cada com um sítio de ligação de antígeno único, e um fragmento "Fc" residual, cujo nome reflete sua capacidade de cristalizar prontamente. O tratamento com pepsina fornece um fragmento $F(ab')_2$ que tem dois sítios de combinação de antígeno e é ainda capaz de reticular antígeno.

"Fv" é o fragmento de anticorpo mínimo que contém um sítio de ligação e reconhecimento de antígeno completo. Em uma espécie Fv de duas cadeias, essa região consiste em um dímero de um domínio variável de uma cadeia pesada e uma leve em associação não covalente justa. Em uma espécie Fv de cadeia única, um domínio variável de cadeia pesada e um de cadeia leve podem ser covalentemente ligados por ligador de peptídeo flexível de tal modo que as cadeias, leve e pesada, possam associar em uma estrutura "dimérica" análoga àquela em uma espécie Fv de duas cadeias. É nessa configuração que os três CDRs de cada domínio variável interagem para definir um sítio de ligação de antígeno na superfície do dímero V_H-V_L . Coletivamente, os seis CDRs conferem especificidade de ligação de antígeno ao anticorpo. Entretanto, mesmo um domínio variável único (ou metade de um Fv compreendendo somente três CDRs específicos para um antígeno) tem a capacidade de reconhecer e ligar antígeno, embora em uma afinidade mais baixa do que o sítio de ligação inteiro.

O fragmento Fab também contém o domínio constante da

cadeia leve e o primeiro domínio constante (C_{H1}) da cadeia pesada. Fragmentos Fab diferem de fragmentos Fab' pela adição de alguns resíduos no terminal carbóxi do domínio C_{H1} de cadeia pesada incluindo uma ou mais cisteínas a partir da região de articulação de anticorpo. Fab'-SH é a designação aqui para Fab' na qual o(s) resíduo(s) de cisteína dos domínios constantes contém um grupo de tiol livre. Fragmentos de anticorpo $F(ab')_2$ eram originalmente produzidos como pares de fragmentos Fab' que têm cisteínas de articulação entre os mesmos.

Anticorpos policlonais podem ser preparados por imunização de um sujeito apropriado (por exemplo, coelho, cabra, camundongo ou outro mamífero) com um imunógeno de proteína de biomarcador. O título de anticorpo no sujeito imunizado pode ser monitorado com o passar do tempo por técnicas padrão, como com um ensaio imunossorvente ligado por enzima (ELISA) utilizando proteína de biomarcador imobilizado. Em um momento apropriado após imunização, por exemplo, quando os títulos de anticorpo são mais elevados, células produtoras de anticorpo podem ser obtidas a partir do sujeito e utilizadas para preparar anticorpos monoclonais por técnicas padrão, como a técnica de hibridoma originalmente descrita por Kohler e Milstein (1975) Nature 256:495-497, a técnica de hibridoma de célula B humana (Kozbor e outros (1983) Immunol. Today 4:72), a técnica de hibridoma-EBV (Cole e outros (1985) em Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, ed. Reisfeld e Sell (Alan R. Liss, Inc., Nova York, NY), páginas 77-96) ou técnicas de tiroma. A tecnologia para produzir hibridomas é bem conhecida (vide genericamente Coligan e outros, eds.

(1994) Current Protocols in Immunology (John Wiley & Sons, Inc., Nova York, NY); Galfre e outros (1977) Nature 266:550-52; Kenneth (1980) em Monoclonal Antibodies: a new dimension in Biological analyses (Plenum Publishing Corp., NY); e Lerner (1981) Yale J. Biol. Med., 54:387-402).

Uma alternativa para preparar hibridomas de secretar anticorpo monoclonal, um anticorpo monoclonal pode ser identificado e isolado por triagem de uma biblioteca de imunoglobulinas combinatória recombinante (por exemplo, uma biblioteca de exibição de fagos de anticorpo) com uma proteína de biomarcador para, desse modo, isolar membros da biblioteca de imunoglobulina que ligam a proteína de biomarcador. Os kits para gerar e fazer triagem de bibliotecas de exibição de fago são comercialmente disponíveis (por exemplo, a Pharmacia Recombinant Phage Antibody System, número do catálogo 27-9400-01; e a Stratagene SurfZAP9 Phage Display kit, número do catálogo 240612). Adicionalmente, os exemplos de métodos e reagentes particularmente favoráveis para uso na geração e triagem de biblioteca de exibição de anticorpo podem ser encontrados, por exemplo, na patente US número 5,223,409; publicação de PCT números WO 92/18619; WO 91/17271; WO 92/20791; WO 92/15679; 93/01288; WO 92/01047; 92/09690; e 90/02809; Fuchs e outros (1991) Bio/Technology 9:1370-1372; Hay e outros (1992) Hum. Antibod. Hybridomas 3:81-85; Huse e outros (1989) Science 246:1275-1281; Griffiths e outros (1993) EMBO J. 12:725-734.

As composições da invenção compreendem, ainda, anticorpos monoclonais e variantes e fragmentos dos mesmos que se ligam especificamente a proteínas de biomarcador de

interesse. Os anticorpos monoclonais podem ser rotulados com uma substância detectável como descrito abaixo, para facilitar a detecção de proteína de biomarcador na amostra. Tais anticorpos encontram uso na prática dos métodos da invenção. Anticorpos monoclonais tendo as características de ligação dos anticorpos revelados aqui são também abrangidos pela presente invenção. As composições compreendem ainda variantes de ligação de antígeno e fragmentos dos anticorpos monoclonais, linhagens de célula de hibridoma produzindo esses anticorpos, e moléculas de ácido nucléico isoladas codificando as seqüências de aminoácido desses anticorpos monoclonais.

Anticorpos tendo as características de ligação de um anticorpo monoclonal da invenção são também fornecidos. "Características de ligação" ou "especificidade de ligação", quando utilizados com referência a um anticorpo, significam que o anticorpo reconhece epítipo antigênico igual ou similar como um anticorpo de comparação. Os exemplos de tais anticorpos incluem, por exemplo, um anticorpo que compete com um anticorpo monoclonal da invenção em um ensaio de ligação competitivo. Uma pessoa versada na técnica poderia determinar se um anticorpo interfere, de forma competitiva, em outro anticorpo utilizando métodos padrão.

Por "epítipo" se quer dizer a parte de uma molécula antigênica na qual um anticorpo é produzido e a qual o anticorpo se ligará. Os epítopos podem compreender resíduos de aminoácido lineares (isto é, resíduos dentro do epítipo são dispostos seqüencialmente um após o outro em um modo linear), resíduos de aminoácido, não lineares (mencionados

aqui como "epítomos não lineares", esses epítomos não são dispostos seqüencialmente), ou resíduos de aminoácido, tanto lineares como não lineares. Tipicamente, epítomos são seqüências de aminoácido curtas, por exemplo, comprimento
5 de aproximadamente cinco aminoácidos. Técnicas sistemáticas para identificar epítomos são conhecidas na arte e são descritas, por exemplo, na patente US número 4,708,871. Resumidamente, um conjunto de oligopeptídeos de sobreposição derivados a partir do antígeno pode ser
10 sintetizado e ligado a um conjunto de fase sólida de pinos, com um oligopeptídeo exclusivo em cada pino. O conjunto de pinos pode compreender uma placa de microtítulo de 96 cavidades, permitindo que uma pessoa ensaie todos os 96 oligopeptídeos simultaneamente, por exemplo, para ligar-se
15 a um anticorpo monoclonal específico de biomarcador. Alternativamente, kits de biblioteca de peptídeo de exibição de fago (New England BioLabs) são atualmente comercialmente disponíveis para mapeamento de epítomos. Utilizando esses métodos, a afinidade de ligação para todo
20 subconjunto possível de aminoácidos consecutivos pode ser determinada para identificar o epítomo que um dado anticorpo liga. Os epítomos podem ser identificados também por inferência quando seqüências de peptídeo de comprimento de epítomo são utilizados para imunizar animais a partir
25 dos quais anticorpos são obtidos. Epítomos podem ser definidos também por cadeias laterais de carboidrato presentes como oligossacarídeos ligados por N ou ligados por O, presentes em glicoproteínas.

Fragmentos de ligação de antígeno e variantes dos
30 anticorpos monoclonais revelados aqui são adicionalmente

fornecidos. Tais variantes reterão as propriedades de ligação desejadas do anticorpo de origem. Os métodos para fazer fragmentos de anticorpo e variantes são genericamente disponíveis na técnica. Por exemplo, variantes de sequência de aminoácidos de um anticorpo monoclonal descrito aqui, podem ser preparadas por mutações na sequência de DNA clonada codificando o anticorpo de interesse. Os métodos para alterações de sequência de nucleotídeo e mutagênese são bem conhecidos na arte. Vide, por exemplo, Walker e Gaastra, eds. (1983) *Techniques in Molecular Biology* (MacMillan Publishing Company, Nova York); Kunkel (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:488-492; Kunkel e outros (1987) *Methods Enzymol.* 154:367-382; Sambrook, e outros, (1989) *Molecular Cloning: a laboratory Manual* (Cold Spring Harbor, Nova York); patente US número 4,873,192; e as referências citadas na mesma; aqui incorporados a título de referência. Orientação com relação a substituições apropriadas de aminoácidos que não afetem a atividade biológica do polipeptídeo de interesse pode ser encontrada no modelo de Dayhoff e outros (1978) em *Atlas of Protein Sequence and Structure* (Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C.) aqui incorporada a título de referência. Substituições conservativas, como permutar um aminoácido por outro tendo propriedades similares, podem ser preferidas. Os exemplos de substituições conservativas incluem, porém não são limitadas a, Gly $\rightleftharpoons$ Ala, Val $\rightleftharpoons$ Ile $\rightleftharpoons$ Leu, Asp $\rightleftharpoons$ Glu, Lys $\rightleftharpoons$ Arg, Asn $\rightleftharpoons$ Gln, e Phe $\rightleftharpoons$ Trp $\rightleftharpoons$ Tyr.

Na construção de variantes do polipeptídeo de anticorpo de interesse, modificações são feitas de tal modo

que variantes continuem a possuir a atividade desejada, isto é, afinidade de ligação similar ao biomarcador. Obviamente, quaisquer mutações feitas no DNA codificando o polipeptídeo variantes não devem colocar a seqüência fora
5 do quadro de leitura e preferivelmente não criarão regiões complementares que poderiam produzir estrutura de mRNA secundária. Vide a publicação do pedido de patente EP no. 75,444.

Preferivelmente, variantes de um anticorpo
10 biomarcador de referência têm seqüências de aminoácidos que têm pelo menos 70% ou 75% de identidade de seqüência, preferivelmente pelo menos 80% ou 85% de identidade de seqüência, mais preferivelmente pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94% ou 95% de identidade de seqüência com a seqüência
15 de aminoácidos para a molécula de anticorpo de referência, ou para uma porção mais curta da molécula de anticorpo de referência. Mais preferivelmente, as moléculas compartilham pelo menos 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade de seqüência. Para fins da presente invenção, a percentagem de identidade
20 de seqüência é determinada utilizando o algoritmo de busca de homologia Smith-Waterman utilizando uma busca de gap afim com uma penalidade de abertura de gap de 12 e uma penalidade de extensão de gap de 2, matriz BLOSUM de 62. O algoritmo de busca de homologia Smith-Waterman é revelado
25 em Smith e Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2:482-489. Uma variante pode, por exemplo, diferir do anticorpo de referência por tão pouco quanto 1 a 15 resíduos de aminoácidos, tão pouco quanto 1 a 10 resíduos de aminoácidos, como 6-10, tão pouco quanto 5, tão pouco
30 quanto 4, 3, 2 ou mesmo 1 resíduo de aminoácido.

Com relação ao alinhamento ótimo de duas seqüências de aminoácidos, o segmento contínuo da seqüência de aminoácido variante pode ter resíduos de aminoácido adicionais ou resíduos de aminoácido deletados com relação
5 à seqüência de aminoácido de referência. O segmento contínuo utilizado para comparação com a seqüência de aminoácidos de referência incluirá pelo menos 20 resíduos de aminoácidos contínuos, e pode ser 30, 40, 50 ou mais resíduos de aminoácidos. Correções para identidade de
10 seqüência associada a substituições de resíduo conservativo ou gaps podem ser feitas (vide o algoritmo de busca de homologia Smith-Waterman).

Uma pessoa versada na técnica reconhecerá que a otimização de reagentes e condições, por exemplo, título de
15 anticorpo e parâmetros para detecção de ligação de anticorpo de antígeno, é necessária para maximizar a razão de sinal para ruído para um anticorpo específico. Concentrações de anticorpo que maximizam ligação específica aos biomarcadores da invenção e minimizam ligação não
20 específica (ou "de segundo plano") serão determinadas. Em modalidades específicas, títulos de anticorpo apropriados são determinados testando inicialmente várias diluições de anticorpo em amostras de soro de paciente. O projeto de ensaios para otimizar condições de detecção e título de
25 anticorpo é padrão e compreendido nas capacidades de rotina daqueles versados na técnica. Alguns anticorpos exigem otimização adicional para reduzir segundo plano e/ou aumentar especificidade e sensibilidade.

Além disso, uma pessoa versada na técnica reconhecerá
30 que a concentração de um anticorpo específico utilizado

para pôr em prática os métodos da invenção variará dependendo de tais fatores como tempo para ligação, nível de especificidade do anticorpo para a proteína de biomarcador, e método de preparação de amostra de corpo.

5 Além disso, quando múltiplos anticorpos são utilizados em uma única amostra, a concentração exigida pode ser afetada pela ordem na qual os anticorpos são aplicados à amostra, isto é, simultaneamente como um coquetel ou seqüencialmente como reagentes de anticorpo individuais. Além disso, a
10 química de detecção utilizada para visualizar ligação de anticorpo a um biomarcador de interesse deve ser também otimizada para produzir a razão de sinal para ruído, desejada.

A detecção de ligação de anticorpo pode ser
15 facilitada por acoplar o anticorpo a uma substância detectável. Os exemplos de substâncias detectáveis incluem várias enzimas, grupos prostéticos, materiais fluorescentes, materiais luminescentes, materiais bioluminescentes, e materiais radioativos. Os exemplos de
20 enzimas apropriadas incluem peroxidase da raiz forte, fosfatase alcalina, β -galactosidade, ou acetil colinesterase; os exemplos de completos de grupos prostéticos apropriados incluem estreptavidina/biotina e avidina/biotina; os exemplos de materiais fluorescentes
25 apropriados incluem umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, fluoresceína de diclorotriazinil amina, cloreto de dansila ou ficoeritrina; um exemplo de um material luminescente inclui luminol; os exemplos de materiais bioluminescentes incluem luciferase,
30 luciferina, e aequorin; e exemplos de material radioativo

apropriado incluem ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S ou ^3H .

Os anticorpos utilizados para pôr em prática a invenção são selecionados para ter elevada especificidade para as proteínas de biomarcador de interesse. Os métodos para fazer anticorpos e para selecionar anticorpos apropriados são conhecidos na técnica. Vide, por exemplo, Celis, ed. (em impressão) Cell Biology & Laboratory Handbook, 3ª edição (Academic Press, Nova York), que é aqui incorporado na íntegra a título de referência. Em algumas modalidades, anticorpos comerciais dirigidos a proteínas de biomarcador específicas podem ser utilizados para pôr em prática a invenção. Os anticorpos da invenção podem ser selecionados com base em coloração desejável de amostras citológicas, em vez de histológicas. Isto é, em modalidades específicas os anticorpos são selecionados com o tipo de amostra final (isto é, amostras de soro) em mente e para especificidade de ligação.

Em outras modalidades, a expressão de um biomarcador de interesse é detectada no nível de ácido nucléico. Técnicas baseadas em ácido nucléico para avaliar expressão são bem conhecidas na técnica e incluem, por exemplo, determinar o nível de mRNA de biomarcador em uma amostra de corpo. Muitos métodos de detecção de expressão utilizam RNA isolado. Qualquer técnica de isolamento de RNA que não seleciona contra o isolamento de mRNA pode ser utilizada para a purificação de RNA a partir de amostras de soro (vide, por exemplo, Ausubel e outros, ed., (1987-1999) Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons, Nova York)). Adicionalmente, grandes números de amostras de sangue, soro ou tecido podem ser prontamente processadas

utilizando técnicas bem conhecidas por aqueles versados na arte, como, por exemplo, o processo de isolamento de RNA de etapa única de Chomczynski (1989, patente US número 4,843,155).

5 O termo "sonda" se refere a qualquer molécula que seja capaz de seletivamente ligar-se a uma biomolécula alvo, especificamente pretendida, por exemplo, um transcrito de nucleotídeo ou uma proteína codificada por ou correspondendo a um biomarcador. Sondas podem ser
10 sintetizadas por uma pessoa versada na técnica, ou derivadas a partir de preparados biológicos apropriados. Sondas podem ser especificamente projetadas para serem rotuladas. Os exemplos de moléculas que podem ser utilizadas como sondas incluem, porém não são limitadas a,
15 RNA, DNA, proteínas, anticorpos e moléculas orgânicas.

O mRNA isolado pode ser utilizado em ensaios de hibridização ou amplificação que incluem, porém não são limitados a, análises Southern ou Northern, análises de reação de cadeia de polimerase e conjuntos de sonda. Um
20 método para a detecção de níveis de mRNA envolve contatar o mRNA isolado com uma molécula de ácido nucléico (sonda) que pode hibridizar com o mRNA codificado pelo gene sendo detectado. A sonda de ácido nucléico pode ser, por exemplo, um cDNA de comprimento total, ou uma porção da mesma, como
25 um oligonucleotídeo de pelo menos 7, 15, 30, 50, 100, 250 ou 500 nucleotídeos em comprimento e suficiente para especificamente hibridizar sob condições rigorosas a um mRNA ou DNA genômico que codifica um biomarcador da presente invenção. A hibridização de um mRNA com a sonda
30 indica que o biomarcador em questão está sendo expresso.

Em uma modalidade, o mRNA é imobilizado em uma superfície sólida e contatado com uma sonda, por exemplo, passando o mRNA isolado em um gel agarose e transferindo o mRNA a partir do gel para uma membrana, como nitrocelulose.

5 Em uma modalidade alternativa, a(s) sonda(s) são imobilizada(s) em uma superfície sólida e o mRNA é contatado com a(s) sonda(s), por exemplo, em um conjunto de chips de gene Affymetrix. Um técnico especializado pode prontamente adaptar métodos de detecção de mRNA conhecidos
10 para uso na detecção do nível de mRNA codificado pelos biomarcadores da presente invenção.

Um método alternativo para determinar o nível de mRNA de biomarcador em uma amostra envolve o processo de amplificação de ácido nucléico, por exemplo, por RT-PCR (a
15 modalidade experimental exposta em Mullis, 1987, patente US número 4,683,202), reação de cadeia de ligase (Barany (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:189-193), replicação de seqüência auto-sustentada (Guatelli e outros (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1874-1878), sistema de
20 amplificação de transcrição (Kwoh e outros (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 1173-1177), Replicase Q-Beta (Lizardi e outros (1988) Bio/Technology 6:1197), replicação de círculo de rolagem (Lizardi e outros, patente US número 5,854,033) ou qualquer outro método de amplificação de
25 ácido nucléico, seguido pela detecção das moléculas amplificadas utilizando técnicas bem conhecidas por aqueles versados na arte. Esses esquemas de detecção são especialmente úteis para a detecção de moléculas de ácido nucléico se tais moléculas estiverem presentes em números
30 muito baixos. Em aspectos específicos da invenção, a

expressão de biomarcador é avaliada por RT-PCR fluorogênico quantitativo (isto é, o Sistema TaqMan®). Tais métodos utilizam, tipicamente, pares de iniciadores de oligonucleotídeo que são específicos para o biomarcador de interesse. Os métodos para projetar iniciadores de oligonucleotídeo específicos para uma sequência conhecida são bem conhecidos na arte.

Níveis de expressão de biomarcador de RNA podem ser monitorados utilizando um blot de membrana (como utilizado em análise de hibridização como Northern, Southern, de pontos, e similar) ou microcavidades, tubos de amostra, géis, contas ou fibras (ou qualquer suporte sólido compreendendo ácidos nucleicos ligados). Vide as patentes US números 5,770,722, 5,874,219, 5,744,305, 5,677,195 e 5,445,934, que são incorporadas aqui a título de referência. A detecção de expressão de biomarcador também pode compreender o uso de sondas de ácido nucléico em solução.

Em uma modalidade da invenção, microconjuntos são utilizados para detectar expressão de biomarcador. Microconjuntos são particularmente bem adequados para essa finalidade devido à capacidade de reprodução entre diferentes experimentos. Microconjuntos de DNA fornecem um método para a medição simultânea dos níveis de expressão de grandes números de genes. Cada conjunto consiste em um padrão reproduzível de sondas de captura ligadas a um suporte sólido. DNA ou RNA rotulado é hibridizado com sondas complementares no conjunto e, então, detectado por varredura laser. Intensidades de hibridização para cada sonda no conjunto são determinadas e convertidas em um

valor quantitativo que representa níveis de expressão de gene relativos. Vide as patentes US números 6,040,138, 5,800,992 e 6,020,135, 6,033,860 e 6,344,316, que são incorporadas aqui a título de referência. Conjuntos de
5 oligonucleotídeo de alta densidade são particularmente úteis para determinar o perfil de expressão de gene para um grande número de RNA's em uma amostra.

Técnicas para a síntese desses conjuntos utilizando métodos de síntese mecânica são descritas, por exemplo, na
10 patente US número 5,384,261, incorporada aqui a título de referência na íntegra para todas as finalidades. Embora uma superfície de conjunto plana seja preferida, o conjunto pode ser fabricado em uma superfície virtualmente de qualquer formato ou mesmo uma multiplicidade de
15 superfícies. Os conjuntos podem ser peptídeos ou ácidos nucleicos em contas, géis, superfícies poliméricas, fibras como fibra ótica, vidro ou qualquer outro substrato apropriado, vide as patentes US números 5,770,358, 5,789,162, 5,708,153, 6,040,193 e 5,800,992, cada uma das
20 quais é incorporada pelo presente na íntegra para todas as finalidades. Os conjuntos podem ser embalados de tal modo a permitir diagnóstico ou outra manipulação de um dispositivo totalmente incluso. Vide, por exemplo, as patentes US números 5,856,174 e 5,992,591, aqui incorporadas a título
25 de referência.

Em uma abordagem, mRNA total isolado a partir da amostra é convertido em cRNA rotulado e então hibridizado com um conjunto de oligonucleotídeos. Cada amostra é hibridizada com um conjunto separado. Níveis de transcrito
30 relativos podem ser calculados por referência a controles

apropriados presentes no conjunto e na amostra.

Kits para pôr em prática os métodos de triagem e diagnóstico da invenção são adicionalmente fornecidos. Por "kit" se quer dizer qualquer fabricação (por exemplo, uma
5 embalagem ou um recipiente) compreendendo pelo menos um reagente, por exemplo, um anticorpo, uma sonda de ácido nucléico, etc., para detectar especificamente a expressão de um biomarcador da invenção. O kit pode ser promovido, distribuído ou vendido como uma unidade para executar os
10 métodos da presente invenção. Adicionalmente, os kits podem conter uma inserção de embalagem descrevendo o kit e métodos para seu uso.

Em modalidades específicas, kits para uso em métodos de triagem para identificar pacientes com probabilidade
15 aumentada de terem câncer de ovário compreendem uma pluralidade de anticorpos dirigidos a proteínas de biomarcador de interesse, particularmente onde os biomarcadores são selecionados a partir do grupo que consiste em HE4, CA125, glicodelina, MMP-7, Muc-1, PAI-1,
20 CTHRC1, inibina A, PLAU-R, prolactina, KLK-10, KLK-6, SLPI, e alfa-1 antitripsina. Produtos químicos para a detecção de ligação de anticorpo ao biomarcador também podem ser incluídos no kit. Outros reagentes para detectar expressão de biomarcadores utilizando anticorpos em uma ELISA ou
25 formato de imunoensaio baseado em conta múltiplex podem ser adicionalmente incluídos em um kit da invenção. Em outras modalidades, kits para uso nos métodos de triagem revelados aqui compreendem sondas de ácido nucléico para a detecção de expressão de uma pluralidade de biomarcadores de
30 interesse em uma amostra de corpo, particularmente onde os

biomarcadores são selecionados a partir do grupo que consiste em HE4, CA125, glicodelina, MMP-7, Muc-1, PAI-1, CTHRC1, inibina A, PLAU-R, prolactina, KLK-10, KLK-6, SLPI, e alfa-1 antitripsina.

5 Em certos aspectos da invenção, são fornecidos kits para executar o método de triagem de duas etapas para identificar pacientes com probabilidade aumentada de terem câncer de ovário. Kits podem ser projetados para executar o método de triagem de duas etapas como dois testes
10 separados. Tais kits incluem reagentes para executar uma única etapa de ensaio (isto é, a primeira ou segunda etapa de ensaio). Em outras modalidades, os kits compreendem reagentes de modo que o método de duas etapas pode ser executado como um teste único (isto é, incluem reagentes
15 tanto para a primeira como segunda etapa de ensaio). Além disso, kits abrangidos pela invenção encontram uso em pôr em prática o método de triagem de etapa única descrito acima. Os kits podem compreender ainda descrições de algoritmos ou modelos matemáticos a serem aplicados com os
20 métodos de triagem de uma etapa ou duas etapas, bem como plataformas automatizadas que implementam os algoritmos/modelos matemáticos com pouca ou nenhuma intervenção humana. Os kits podem ser adicionalmente fornecidos de tal modo que cada etapa no método de duas
25 etapas seja executada em um modo automatizado, semi-automatizado ou manual.

Kits para diagnosticar câncer de ovário também são fornecidos. Tais kits podem incluir anticorpos ou sondas de ácido nucléico que são específicos para detecção de uma
30 pluralidade de biomarcadores que são seletivamente

superexpressos em câncer de ovário, mais particularmente HE4, CA125, glicodelina, MMP-7, Muc-1, PAI-1, CTHRC1, inibina A, PLAU-R, prolactina, KLK-10, KLK-6, SLPI, e alfa-1 antitripsina.

5 Uma pessoa versada na técnica reconhecerá ainda que qualquer uma ou todas as etapas nos métodos de triagem e diagnóstico da invenção poderia ser implementada por pessoal ou alternativamente, executada em um modo automatizado. Isto é, os métodos podem ser executados em um
10 modo automatizado, semi-automatizado ou manual. Além disso, os métodos revelados aqui podem ser também combinados com outros métodos conhecidos ou posteriormente desenvolvidos para permitir uma identificação mais precisa de pacientes com probabilidade aumentada de terem câncer de ovário ou um
15 diagnóstico mais seguro de câncer de ovário.

O artigo "um" e "uma" é aqui utilizado para se referir a um ou mais de um (isto é, pelo menos um) do objeto gramatical do artigo. Como exemplo, "um elemento" significa um ou mais elementos.

20 Em todo relatório descritivo a palavra "compreendendo" ou variações como "compreende" ou "que compreende" serão entendidas como envolvendo a inclusão de um elemento mencionado, número inteiro ou etapa, ou grupo de elementos, números inteiros ou etapas, porém não a
25 exclusão de qualquer outro elemento, número inteiro ou etapa, ou grupo de elementos, números inteiros ou etapas.

Os seguintes exemplos são oferecidos como ilustração e não como limitação:

EXPERIMENTAL

30 Exemplo 1: Método exemplar para coleta de sangue,

processamento de sangue em soro, condições de armazenagem
de soro e condições de transporte de soro

Coleta de sangue

Uma quantidade suficiente de sangue foi tirada por
5 venopuntura em tubos de coleta com topo vermelho Vacutainer
da Becton Dickinson não contendo aditivo (número do
catálogo 366430). O número de lote do tubo de coleta de
sangue foi registrado. Sangue integral não foi refrigerado
ou congelado. O processamento do sangue integral em soro
10 começou imediatamente após coleta do sangue.

Procedimento de preparação de soro

Tubos de coleta de sangue foram colocados
verticalmente em uma prateleira e armazenados em
temperatura ambiente. O sangue foi deixado coagular por um
15 período mínimo de 60 minutos e máximo de 90 minutos a
partir do momento de coleta. Sangue foi totalmente
coagulado antes da centrifugação. O tempo necessário para
coagulação completa para cada amostra foi registrado.

Após coagulação total do sangue, as amostras foram
20 centrifugadas em 1300xg por 10 minutos utilizando um rotor
de centrífuga de cabeça oscilante ou ângulo fixo. Os tubos
foram cuidadosamente removidos a partir da centrífuga para
evitar perturbar as hemácias no fundo.

O tampo foi retirado de cada tubo sem perturbar a
25 pelota de células. O soro de cada doador foi combinado em
um tubo rotulado utilizando uma pipeta de transferência
descartável sem perturbar a camada de células ou permitir a
entrada de quaisquer células na pipeta. Se as células forem
perturbadas durante transferência, as amostras foram re-
30 centrifugadas como descrito acima.

Amostras de soro de cada doador foram misturadas invertendo suavemente o tubo cinco vezes. Alíquotas de um mL foram colocadas em tubos rotulados e congeladas a -20°C até -80°C . Soro não foi armazenado em temperatura ambiente por mais de duas horas ou em $2-8^{\circ}\text{C}$ por mais de oito horas antes do congelamento.

Exemplo 2: Estudo de seleção de biomarcador de ovário
- análise de biomarcador individual

A finalidade do estudo de seleção de biomarcador foi de avaliar a utilidade clínica inicial de um conjunto de quatorze biomarcadores candidatos de câncer de ovário. A premissa do estudo era ser capaz de identificar e quantificar a quantidade de cada biomarcador no soro de um paciente. A expressão de proteína de biomarcador em amostras de soro foi detectada utilizando anticorpos específicos de biomarcador comerciais ou novos em um formato de ELISA. Quatorze biomarcadores alvo foram analisados, conforme descrito abaixo na Tabela 1:

Tabela 1. Marcadores Candidatos

HE4	CA125
SLPI	Glicodelina
KLK6	MMP7
KLK10	PLAU-R
CTHRC1	Inibina
PAI-1	Prolactina
MUC1	Alfa-1 antitripsina

20 População alvo e demografia do estudo

Em avaliações desse tipo, é essencial que as amostras testadas sejam representativas da população clínica, alvo, e que controles normais sejam casados demograficamente. Um

total de 900 amostras de soro de pacientes foi analisado nesse estudo. 200 das amostras eram de pacientes com câncer no ovário em vários estágios da doença (isto é, as 200 amostras foram divididas uniformemente entre amostras de 5 câncer de ovário estágio 1, 2, 3). Um total de 500 soros normais foi utilizado no estudo. 104 das amostras de soro normal eram de mulheres pós-menopausa (definido como mulheres com mais de 55 anos de idades para o presente estudo) para estabelecer os níveis de linha de base de cada 10 biomarcador e calcular os valores cut-off limite apropriados. As 396 amostras de soro normais restantes foram divididas uniformemente entre mulheres pré-menopausa com menos de 55 anos de idade e mulheres pós-menopausa com mais de 55 anos de idade. Essa distribuição permitiu a 15 pesquisa de quaisquer distribuições de pacientes relacionadas à idade ou hormônio. As 200 amostras restantes no estudo foram coletadas a partir de doadores com várias condições/doenças, como descrito acima (isto é, "condições interferentes" ou "patologias interferentes"). A inclusão 20 dessas amostras permitiu a análise de quaisquer patologias interferentes que podem afetar o desempenho de biomarcador individual. Os sumários das populações de pacientes analisadas e demografia de estudo são fornecidos nas tabelas 2-4.

25 **Tabela 2: Demografia de casos de amostra no estudo**

Características	Câncer de ovário	Estudo de normais	Patologias interferentes	Limite de normais
			s	

Número total de amostras	200	396	200	104
Idade em diagnóstico (anos)				
Média (padrão)	55,5 (11,5)	55,3 (9,7)	57,0 (18,3)	63,0 (6,9)
faixa	19-81	40-84	20-97	41-80
Distribuição de grupo de idade				
<=55	100 (50%)	201 (50,8%)	92 (46%)	2 (1,9%)
>55	100 (50%)	195 (49,2%)	108 (54%)	102 (98,1%)
Raça, n				
Americano-africano	10 (5%)	3 (1%)	12 (6%)	0
Caucasiano	183 (92%)	389 (99%)	185 (92,5%)	98 (100%)
Outras	6 (3%)	1 (<1%)	3 (1,5%)	0
ausente	1	3	0	6

Tabela 3: Características clínicas de pacientes com câncer de ovário em estudo

	Frequência	Porcentagem
estágio de Câncer de ovário, n	200	
1	67	33,5%
2	66	33%
3	67	33,5%
Classificação histológica, n	197	
Célula clara	10	5%
Endometrióide	39	19%
Seroso	23	12%
Com mucina	36	18%
Adenocarcinoma	49	25%
Papilar	25	13%
Não classificado	13	7%

Sarcoma estromal

2

1%

**Tabela 4: Distribuição de substâncias/patologias
interferentes**

	Categoria	Número	Percentagem
Hormonal	1º trimestre gravidez	10	5,0
	Pílulas contraceptivas	5	2,5
	Terapia de reposição hormonal	9	4,5
	Menstruação	9	4,5
Câncer	Câncer de mama	27	13,5
	Câncer de cólon	15	7,5
	Câncer retal	2	1,0
	Mieloma múltiplo	1	0,5
Vascular	Doença de artéria coronária	9	4,5
	Trombose de veia profunda	1	0,5
	Tratamento com warfarin	15	7,5
Metabólica	Diabetes	10	5,0
	Hepatite crônica	10	5,0
Gin.	Endometriose	25	12,5
	Cistos de ovário/policístico	10	5,0
Inflamatório	Polimialgia	10	5,0
	Polimiosite	3	1,5
	Artrite reumatóide	27	13,5
	SLE	2	1,0

Descrição geral de análise de automação e validação para o

estudo

Todas as 900 amostras de soro foram processadas em duplicata para cada um dos 14 marcadores. Um sistema de ensaio automatizado com rastreamento de código de barras
5 foi utilizado na geração dos dados de seleção de marcador. Os ensaios feitos nesse estudo de seleção de marcador foram todos concluídos utilizando um manipulador de líquido robótico automatizado Tecan Evo. O uso dessa plataforma permitiu que todas as 900 amostras fossem processadas para
10 cada marcador em um curso experimental único (um curso por dia). A precisão da plataforma automatizada foi verificada antes do processamento de quaisquer amostras de estudo.

Todos os ensaios ELISA foram processados para esse estudo utilizando uma solução tamponada como o diluente
15 para a curva padrão. Isso foi feito para padronizar, tanto quanto possível, os protocolos para cada um dos ensaios.

Os soros normais utilizados nesse estudo foram obtidos a partir de centros de coleta de sangue da comunidade em conformidade com costumes IRB locais. Embora
20 esses soros possam ser considerados 'normais', deve ser observado que esses doadores não foram classificados por um profissional médico para confirmar seu estado normal ou livre de doença.

Detecção de expressão de HE4 em amostras de soro (um
25 exemplo representativo)

*Materiais e métodos*A. Revestimento de placas de ensaios:

Placas com 96 cavidades ELISA foram revestidas com
100 µl/cavidade do anticorpo primário, monoclonal anti-HE4
30 90,1 #6, em 2 µg/ml em PBS, a seguir as placas foram

incubadas a 4°C durante a noite. No dia seguinte, as placas foram lavadas com PBS, a seguir 250 µg/cavidade de PBS-3% BSA foi adicionado a todas as cavidades, e as placas foram incubadas por 2 horas em 30°C. As placas foram então
5 esvaziadas e secas em um forno sob vácuo por 2 horas em temperatura ambiente. Então foram vedadas a calor dentro de um saco de folha mylar juntamente com um pacote dessecante e armazenadas a 4°C até ser utilizada em um ensaio.

B. Métodos de ensaio

10 Os sacos de folha contendo as placas de ensaio foram aquecidos até a temperatura ambiente imediatamente antes do uso no ensaio. As amostras de soro foram diluídas 1:4 em PBS-soro bovino 1% - 0,05% Tween 20-1 mg/ml de IgG de camundongo. A proteína de antígeno de HE4 foi diluída a 100
15 ng/ml, a seguir diluída em série duas vezes em PBS-1% de soro bovino - 0,05% Tween 20 - 1 mg/ml de IgG de camundongo, então todas as amostras de curva padrão individuais foram adicionalmente diluídas 1:4 no tampão de modo que seriam diluídas iguais as amostras de soro.

20 As amostras de soro diluídas e amostras de curva padrão foram adicionadas às placas de ensaio revestidas com anti-HE4 em volumes de 100 µl/cavidade. A seguir as placas foram incubadas por 2 horas a 30°C. As placas foram lavadas a seguir 5x com 250µl/cavidade de PBS-0,05% Tween 20.

25 O anticorpo secundário, monoclonal anti-HE4 71,1#1,13-HRP, foi diluído 1:16,000 em PBS-1% IgG bovino-0,05% Tween 20- 1 mg/ml de IgG de camundongo. A solução de anticorpo secundária foi então adicionada às placas aspiradas em volumes de 100 µl/cavidade. As placas foram
30 incubadas por 1 hora a 30°C.

As placas foram lavadas 5x com 250µl/cavidade de PBS-0,05% Tween 20. A solução de revelação, TMB (3,3',5,5'-tetrametil benzidina) foi aquecida à temperatura ambiente antes do uso, e então a TMB foi adicionada às placas aspiradas em volumes de 100 µl/cavidade.

As placas foram incubadas por 10 minutos em temperatura ambiente e então a solução de Parar, 2N H₂SO₄, foi adicionada às placas (contendo o TMB) em volumes de 100 µl/cavidade.

As placas foram incubadas por 10 minutos em temperatura ambiente, e então foram lidas na leitora de placa SpectraMax da Molecular Devices a 450 nm, com um comprimento de onda de referência de 650 nm, utilizando software SoftMax Pro.

Os dados foram salvos como arquivos SoftMax Pro, e também exportados como arquivos de texto para uso com MS Excel.

Controles: soro utilizado como o Controle elevado: Uniglobe #72372

Soro utilizado como o Controle baixo: Uniglobe #72404
Controle de tampão utilizado foi PBS-1% de soro bovino - 0,05% Tween 1 mg/ml de IG de camundongo

Os CV's para os controles através de todas as 25 placas são resumidos na tabela 5.

Tabela 5: Os CV's para os controles através de todas as 25 placas

% de CV de ponto por ponto padrões através de todas as 25 placas			
ng/ml	DE médio	SD	CV%
100	2,614	0,145	5,6

50	1,681	0,101	6,0
25	0,931	0,075	8,1
12,5	0,510	0,043	8,4
6,25	0,263	0,027	10,4
3,13	0,139	0,014	10,0
1,56	0,076	0,008	10,5
0,78	0,044	0,012	27,6

Resultados (curvas padrão)

Uma curva padrão para HE4 foi preparada diluindo a proteína HE4 em PBS/1% de soro bovino/0,05% Tween 20-1 mg/mL de IgG de camundongo. A preparação de tais curvas padrão é bem conhecida na técnica. Curvas padrão e os níveis ou concentrações dos biomarcadores em todas as amostras de soro foram produzidos para os biomarcadores restantes, essencialmente como descrito acima para HE4, com variações que poderiam ser apreciadas e implementadas por uma pessoa versada na técnica. Faixas de curva padrão e equações de ajuste de curva para os biomarcadores analisados (isto é, HE4, glicodelina, SPLI, PLAU-R, MUC-1, PAI-1, MMP-7, inibina, CA125, CTHRC1, KLK-6, KLK-10, alfa-1 antitripsina, e prolactina) são apresentadas abaixo:

15 HE4

. Faixa experimental de curva padrão = 0,78 ng/ml a 100 ng/ml, em diluições seriadas em duas vezes

. ajuste de curva = polinômio de terceira ordem, $y = -1E-07x^3 - 0,0001x^2 + 0,0402x + 0,0157$; $R^2 = 0,9999$

20 . As amostras de curva padrão e as amostras de soro foram então ambas diluídas 1:4 para conduzir o ensaio; uma vez que tanto as amostras de soro como as amostras de curva padrão foram diluídas do mesmo modo não houve necessidade

de utilizar um fator de diluição durante análise de dados para determinar as concentrações das amostras desconhecidas de soro.

Glicodelina

5 . Faixa experimental de curva padrão = 3 ng/ml a 100 ng/ml, em diluições seriadas em duas vezes

. ajuste de curva = quadrática, $y = -0,0003x^3 + 0,0478x + 0,0952$; $R^2 = 0,9851$

10 . as amostras de soro foram conduzidas no ensaio não diluídas, de modo que nenhum fator de diluição foi utilizado na análise de dados.

SPLI

Faixa experimental de curva padrão = 2,38 ng/ml a 305 ng/ml, em diluições seriadas em duas vezes

15 . ajuste de curva = polinômio de terceira ordem, $y = -7E-05x^3 - 7E-05x^2 + 0,0237x + 0,039$; $R^2 = 0,9997$

20 . As amostras de soro foram diluídas 1:6,1 em uma etapa inicial da técnica de preparação automatizada de amostra. A seguir aquelas amostras de soro diluídas foram adicionalmente diluídas 1:6,6 em outra etapa automatizada para obter uma diluição total de 1:40. Aquelas amostras diluídas 1:40 foram então conduzidas no ensaio.

25 . As amostras de curva padrão foram preparadas nas concentrações mencionadas acima (faixa experimental), a seguir aquelas amostras de curva padrão foram todas adicionalmente diluídas 1:6,1, e aquelas amostras diluídas 1:6,1 foram então conduzidas no ensaio.

30 . Uma vez que havia uma discrepância entre a diluição das amostras de soro (1:40) em comparação com a diluição das amostras de curva padrão (1:6,1), todos os valores de

concentração de amostra de soro obtidos a partir da curva padrão foram multiplicados por um fator de diluição de "6,6" para corrigir a discrepância ($1:40 = 1:6,1 \times 1:6,6$).

UPar (PLAU-R)

5 . Faixa experimental de curva padrão = 62,5 pg/ml a 4000 pg/ml, em diluições seriais em duas vezes.

. ajuste de curva = linear, $y = 0,0006x + 0,0522$; $R^2 = 0,9977$

10 . As amostras de soro foram diluídas 1:6 em uma etapa inicial da técnica de preparação automatizada de amostra. A seguir aquelas amostras de soro diluídas foram adicionalmente diluídas 1:3 em outra etapa automatizada para obter uma diluição total de 1:18. Aquelas amostras diluídas 1:18 foram então conduzidas no ensaio.

15 . As amostras de curva padrão foram preparadas nas concentrações mencionadas acima (faixa experimental), a seguir aquelas amostras de curva padrão foram todas adicionalmente diluídas 1:3, e aquelas amostras diluídas 1:3 foram então conduzidas no ensaio.

20 . Uma vez que havia uma discrepância entre a diluição das amostras de soro (1:18) em comparação com a diluição das amostras de curva padrão (1:3), todos os valores de concentração de amostra de soro obtidos a partir da curva padrão foram multiplicados por um fator de diluição de "6" para corrigir a discrepância ($1:18 = 1:3 \times 1:6$).

25

MUC-1

. Faixa experimental de curva padrão = 0,3 U/ml a 600 U/ml, em diluições seriais em três vezes

30 . ajuste de curva = polinômio de terceira ordem, $y = 3E-07x^3 - 0,0001x^2 + 0,0236x + 0,0371$;

$$R^2 = 1,0$$

. as amostras de curva padrão e as amostras de soro foram então ambas diluídas 1:2 para conduzir o ensaio; uma vez que tanto as amostras de soro como as amostras de curva padrão foram diluídas do mesmo modo não houve necessidade de utilizar um fator de diluição durante análise de dados para determinar as concentrações das amostras de soro desconhecidas.

PAI-1

10 . Faixa experimental de curva padrão = 0,78 ng/ml a 100 ng/ml, em diluições seriais em duas vezes

. ajuste de curva = linear, $y = 0,0139x + 0,0151$; $R^2 = 0,9996$

15 . as amostras de curva padrão e as amostras de soro foram então ambas diluídas 1:4 para conduzir o ensaio; uma vez que tanto as amostras de soro como as amostras de curva padrão foram diluídas do mesmo modo não houve necessidade de utilizar um fator de diluição durante análise de dados para determinar as concentrações das amostras de soro desconhecidas.

MMP-7

. Faixa experimental de curva padrão = 0,16 ng/ml a 20 ng/ml, em diluições seriais em duas vezes

25 . ajuste de curva = polinômio de terceira ordem, $y = 0,0001x^3 - 0,0046x^2 + 0,1578x + 0,0936$; $R^2 = 0,9999$

. as amostras de curva padrão e as amostras de soro foram então ambas diluídas 1:1 para conduzir o ensaio; uma vez que tanto as amostras de soro como as amostras de curva padrão foram diluídas do mesmo modo não houve necessidade de utilizar um fator de diluição durante análise de dados

para determinar as concentrações das amostras de soro desconhecidas.

Inibina

. Faixa experimental de curva padrão = 10 pg/ml a
5 1000 pg/ml, diluições seriadas em duas vezes

. ajuste de curva = linear, $y = 0,0007x + 0,0136$; $R^2 = 0,9997$

. as amostras de curva padrão e as amostras de soro foram então ambas diluídas 1:3 para conduzir o ensaio; uma
10 vez que tanto as amostras de soro como as amostras de curva padrão foram diluídas do mesmo modo não houve necessidade de utilizar um fator de diluição durante análise de dados para determinar as concentrações das amostras de soro desconhecidas.

15 CA125

. Faixa experimental de curva padrão = 15U/ml a 400 U/ml, diluições seriadas em duas vezes

. ajuste de curva = linear, $y = 0,0021x + 0,0892$; $R^2 = 0,9986$

20 . as amostras de soro foram conduzidas no ensaio não diluídas, assim nenhum fator de diluição foi utilizado na análise de dados.

CTHRC1

. Faixa experimental de curva padrão = 0,78 ng/ml a
25 100 ng/ml, em diluições seriadas em duas vezes

. Ajuste de curva = linear; $y = 0,0261x + 0,042$; $R^2 = 0,9991$

. as amostras de curva padrão e as amostras de soro foram então ambas diluídas 1:2 para conduzir o ensaio; uma
30 vez que tanto as amostras de soro como as amostras de curva

padrão foram diluídas do mesmo modo não houve necessidade de utilizar um fator de diluição durante análise de dados para determinar as concentrações das amostras de soro desconhecidas.

5 KLK-6

. Faixa experimental de curva padrão = 0,78 ng/ml a 100 ng/ml, em diluições seriais em duas vezes

. ajuste de curva = polinômio de terceira ordem, $y = -4E-07x^3 + 0,0001x^2 + 0,0133x + 0,0662$;

10 $R^2 = 1,0$

. as amostras de curva padrão e as amostras de soro foram então ambas diluídas 1:1 para conduzir o ensaio; uma vez que tanto as amostras de soro como as amostras de curva padrão foram diluídas do mesmo modo não houve necessidade de utilizar um fator de diluição durante análise de dados para determinar as concentrações das amostras de soro desconhecidas.

KLK-10

. Faixa experimental de curva padrão = 1 ng/ml a 80 ng/ml, em diluições seriais em duas vezes

. ajuste de curva = linear; $y = 0,0758x - 0,0312$; $R^2 = 0,9976$

. as amostras de curva padrão e as amostras de soro foram então ambas diluídas 1:4 para conduzir o ensaio; uma vez que tanto as amostras de soro como as amostras de curva padrão foram diluídas do mesmo modo não houve necessidade de utilizar um fator de diluição durante análise de dados para determinar as concentrações das amostras de soro desconhecidas.

30 Alfa 1 antitripsina

. Faixa experimental de curva padrão = 3,3 ng/ml a 90 ng/ml, em diluições seriadas em duas vezes

. ajuste de curva = quadrático, $y = -0,0002x^2 + 0,0412x + 0,0592$; $R^2 = 0,9997$

5 . As amostras de soro foram diluídas 1:250,000, e então aquelas amostras diluídas foram conduzidas no ensaio. As amostras de curva padrão foram diluídas em série como mencionado acima (faixa experimental) e então aquelas amostras foram conduzidas no ensaio.

10 . Uma vez que houve uma discrepância entre a diluição das amostras de soro (1:250,000) em comparação com a diluição das amostras de curva padrão (não diluída além das diluições seriadas), todos os valores de concentração de amostra de soro obtidos a partir da curva padrão foram
15 multiplicados por um fator de diluição de "250,000" para corrigir a discrepância.

Prolactina

. faixa experimental de curva padrão = 2 ng/ml a 240 ng/ml, em diluições seriadas em duas vezes

20 . ajuste de curva = linear, $y = 0,0049x + 0,0363$; $R^2 = 0,9917$

. as amostras de curva padrão e as amostras de soro foram então ambas diluídas 1:5 para conduzir o ensaio; uma vez que tanto as amostras de soro como as amostras de curva
25 padrão foram diluídas do mesmo modo não houve necessidade de utilizar um fator de diluição durante análise de dados para determinar as concentrações das amostras de soro desconhecidas.

Resultados - desempenho individual de marcador

30 Entre os 500 casos normais utilizados no presente

estudo, 104 casos normais foram utilizados como grupo de controle para selecionar o ponto de corte limite. A Tabela 6 provê a média, desvio padrão, faixa, média+2*padrão, média+3*padrão baseado nesses 104 casos normais limite para cada marcador. A Tabela 7 e Tabela 8 fornecem o desvio médio padrão, faixa, média+2*padrão em todos os casos normais de estudo (396 casos) e com casos normais de estudo a partir de pacientes acima de 55 anos de idade (195 ou menos). Os desvios médio e padrão foram muito similares entre os casos de controle limite normais e os casos normais de estudo para pacientes acima de 55 anos de idade para cada biomarcador exceto para marcadores HE4 e Inibina. Vide as Tabelas 6 e 8.

Tabela 6: Média e Padrão de cada biomarcador em 105 casos normais de controle

Variável	N	Média	Padrao Dev	Mín	Máx	Média + 2*pad	Média + 3*pad	Melhor Corte
HE4	104	1,7	0,91	0,5	6,6	3,5	4,4	2,2
CA125	104	6,9	6,42	0,6	42,6	19,7	26,1	20
GLY	104	1,8	2,75	0,0	18,6	7,4	10,1	5
MMP	104	3,4	1,05	1,9	7,0	5,5	6,5	4
Muc1	104	12,5	10,71	0,1	51,8	33,9	44,6	12
PAI	104	74,8	24,92	16,4	143,2	124,7		95
CTRHCl	104	3,2	1,16	1,2	6,2	5,5		4
INH	104	0,6	2,80	0,0	26,9	6,2	9,0	2
Plau-R	104	1945,4	534,03	1056,00	4248,0	3013,4	3547,5	2399,9
PROLAC	104	10,2	10,94	3,1	102,2	32,0	43,0	11
KLK10	104	0,8	0,51	0,3	2,3	1,8		0,9
KLK6	104	2,2	2,39	0,3	16,3	7,0	9,4	5
SLPI	104	65,7	14,38	40,2	134,5	94,5	108,9	65

Tabela 7: Média e Padrão de cada biomarcador em 396 casos normais de estudo

Variável	N	Média	Pad. Dev	Mín	Máx	Média + 2*pad
HE4	396	1,6	2,1	0,2	36,4	5,8*
CA125	396	10,4	14,2	1,7	212,4	38,7*
GLY	396	5,0	10,2	0,0	98,4	25,3*
MMP	396	3,0	1,1	0,8	10,4	5,1
Muc1	396	8,3	8,2	0,0	52,1	24,7
PAI	396	73,2	28,0	18,8	145,7	129,2
CTRHCl	396	2,9	1,2	0,4	8,7	5,2
INH	360	11,3	28,1	0,0	265,4	67,5*
PLAUR	396	2086,0	782,0	822,0	6384,00	3650
PROLAC	396	11,6	9,5	2,0	138,0	30,7
KLK10	396	0,9	0,4	0,2	2,5	1,7
KLK6	396	1,7	1,7	0,1	18,0	5,1
SLPI	396	59,6	18,0	31,3	305,0	95,6

*os valores em casos normais foram muito diferentes dos valores em casos normais de controle, o que significa que esses marcadores poderiam ser sensíveis devido ao efeito de idade

Tabela 8: Média e padrão de cada biomarcador em casos normais de estudo (Pacientes acima de 55 anos de idade)

Variável	N	Média	Pad Dev	Mín	Máx	Média + 2*pad
HE4	195	2,0	2,8	0,2	36,4	7,6*
CA125	194	10,6	5,6	2,3	35,7	21,9
GLY	195	1,7	2,3	0,0	24,8	6,3
MMP	195	3,2	1,2	0,8	10,4	5,6
Muc1	195	8,9	8,4	0,0	36,6	25,7
PAI	195	75,6	27,9	19,1	145,7	131,3

CTHRC1	195	3,2	1,1	1,2	7,1	5,4
INH	177	5,2	26,6	0,0	265,4	58,5**
PLAUR	195	2209,5	752,1	1122,0	5100,0	3713,7
PROLAC	195	10,8	11,1	2,0	138,0	32,9
KLK10	195	0,9	0,4	0,2	2,4	1,7
KLK6	195	1,8	2,0	0,1	18,0	5,7
SLPI	195	60,3	14,2	31,3	126,9	88,6

* O desvio padrão era maior nos casos normais de estudo do que nos casos normais de controle para pacientes acima de 55 anos de idade

** a média e desvio padrão foram maiores nos casos normais de estudo do que nos casos normais de controle para pacientes acima de 55 anos de idade

Para cada marcador individual, a curva ROC foi obtida. A curva ROC consiste somente dos 396 casos normais e dos 200 casos de câncer de ovário. Os 104 casos normais como controle e 200 casos de patologia/substância interferente não foram incluídos nessa análise. As curvas ROC para HE4, Inibina A, prolactina, PLAU-R, glicodelina, SLPI, CTHRC1, PAI-1, KLK-10, CA125, KLK-6, MUC-1 e MMP-7 são apresentados nas figuras 2-14, respectivamente.

Também, a percentagem de amostras positivas e negativas foi determinada para cada marcador por grupo de idade, por estágio de câncer, e por categoria de patologia/substância interferente. Essas determinações foram baseadas em dois tipos de pontos de corte: (1) média+2*pad, e (2) o melhor corte a partir da curva ROC. Os melhores pontos de corte foram selecionados a partir da curva ROC com o valor mais elevado de sensibilidade mais especificidade. O melhor ponto de corte foi listado na

Tabela 6. Sumários dos resultados positivos para cada biomarcador por grupo de idade, estágio de câncer, e categoria de patologia/substância interferente são apresentados nas tabelas 9 a 47.

5 Biomarcador: HE4

Tabela 9: Sumário por grupo de idade para HE4

		Melhor Corte a partir do gráfico ROC				Média+2*pad			
		Idade ≤55		Idade >55		Idade ≤55		Idade >55	
Grupo	Resultado	N	%	N	%	N	%	N	%
IP	Positivo	57	63,33	98	90,74	41	45,56	81	75,00
	Negativo	33	36,67	10	9,26	49	54,44	27	25,00
	Total	90	100,00	108	100,00	90	100,00	108	100,00
NORMAL	Positivo	15	7,46	39	20,00	3	1,49	13	6,67
	Negativo	186	92,54	156	80,00	198	98,51	182	93,33
	Total	201	100,00	195	100,00	201	100,00	195	100,00
OvCA	Positivo	81	81,00	91	91,00	58	58,00	75	75,00
	Negativo	19	19,00	9	9,00	42	42,00	25	25,00
	Total	100	100,00	100	100,00	100	100,00	100	100,00

Tabela 10: Sumário por categoria de patologia/substância interferente para HE4

		Melhor Corte a partir do gráfico ROC		Média+2*pad	
Grupo	Resultado	N	%	N	%
Tumores	Positivo	38	84,44	27	60,00
	Negativo	7	15,56	18	40,00
	Total	45	100,00	45	100,00

Distúrbio metabólico	Positivo	20	100,00	20	100,00
	Negativo	0	0,00	0	0,00
	Total	20	100,00	20	100,00
Flutuação hormonal	Positivo	23	69,70	16	48,48
	Negativo	10	30,30	17	51,52
	Total	33	100,00	33	100,00
Distúrbio ginecológico	Positivo	17	48,57	12	34,29
	Negativo	18	51,43	23	65,71
	Total	35	100,00	35	100,00
Distúrbio vascular	Positivo	22	88,00	19	76,00
	Negativo	3	12,00	6	24,00
	Total	25	100,00	25	100,00
Distúrbio imuno crônico	Positivo	37	88,10	29	69,05
	Negativo	5	11,90	13	30,95
	Total	42	100,00	42	100,00

Tabela 11: Sumário por estágio de câncer para HE4

		Melhor corte a partir de gráfico ROC		Média+2*pad	
estágio	Resultado	N	%	N	%
1	Positivo	57	85,07	42	62,69
	Negativo	10	14,93	25	37,31
	Total	67	100,00	67	100,00
2	Positivo	53	80,30	41	62,12
	Negativo	13	19,70	25	37,88
	Total	66	100,00	66	100,00
3	Positivo	62	92,54	50	74,63
	Negativo	5	7,46	17	25,37

Biomarcador Muc-1

Tabela 12: Sumário por grupo de idade para Muc-1

		Melhor corte a partir do gráfico ROC				Média+2*pad			
		Idade <=55		Idade>55		Idade <=55		Idade>55	
Grupo	Resultado	N	%	N	%	N	%	N	%
IP	Positivo	38	42,22	53	49,07	4	4,44	9	8,33
	Negativo	52	57,78	55	50,93	86	95,56	99	91,67
	Total	90	100,00	108	100,00	90	100,00	108	100,00
NORMAL	Positivo	49	24,38	58	29,74	2	1,00	4	2,05
	Negativo	152	75,62	137	70,26	199	99,00	191	97,95
	Total	201	100,00	195	100,00	201	100,00	195	100,00
OvCA	Positivo	56	56,00	52	52,00	4	4,00	12	12,00
	Negativo	44	44,00	48	48,00	96	96,00	88	88,00
	Total	100	100,00	100	100,00	100	100,00	100	100,00

Tabela 13: Sumário por categoria de patologia/substância interferente para Muc-1

		Melhor corte a partir do gráfico ROC		Média + 2*pad	
Grupo	Resultado	N	%	N	%
Tumores	Positivo	20	44,44	3	6,67
	Negativo	25	55,56	42	93,33
	Total	45	100,00	45	100,00
Distúrbio metabólico	Positivo	8	40,00	1	5,00
	Negativo	12	60,00	19	95,00
	Total	20	100,00	20	100,00
Flutuação hormonal	Positivo	14	42,42	1	3,03
	Negativo	19	57,58	32	96,97
	Total	33	100,00	33	100,00

Distúrbio ginecológico	Positivo	17	48,57	1	2,86
	Negativo	18	51,43	34	97,14
	Total	35	100,00	35	100,00
Distúrbio vascular	Positivo	11	44,00	2	8,00
	Negativo	14	56,00	23	92,00
	Total	25	100,00	25	100,00
Distúrbio imuno crônico	Positivo	22	52,38	5	11,90
	Negativo	20	47,62	37	88,10
	Total	42	100,00	42	100,00

Tabela 14: Sumário por estágio de câncer para Muc-1

		Melhor corte a partir do gráfico ROC		Média + 2*pad	
Estágio	Resultado	N	%	N	%
1	Positivo	44	65,67	6	8,96
	Negativo	23	34,33	61	91,04
	Total	67	100,00	67	100,00
2	Positivo	27	40,91	3	4,55
	Negativo	39	59,09	63	95,45
	Total	66	100,00	66	100,00
3	Positivo	37	55,22	7	10,45
	Negativo	30	44,78	60	89,55
	Total	67	100,00	67	100,00

Biomarcador: KLK-6

Tabela 15: Sumário por grupo de idade para KLK-6

		Melhor corte a partir do gráfico ROC				Média + 2*pad			
		Idade <=55		Idade >55		Idade <=55		Idade >55	
Grupo	Resultado	N	%	N	%	N	%	N	%
IP	Positivo	5	5,56	8	7,41	4	4,44	4	3,70

	Negativo	85	94,44	100	92,59	86	95,56	104	96,30
	Total	90	100,00	108	100,00	90	100,00	108	100,00
NORMAL	Positivo	6	2,99	11	5,64	2	1,00	5	2,56
	Negativo	195	97,01	184	94,36	199	99,00	190	97,44
	Total	201	100,00	195	100,00	201	100,00	195	100,00
OvCA	Positivo	10	10,00	13	13,00	4	4,00	6	6,00
	Negativo	90	90,00	87	87,00	96	96,00	94	94,00
	Total	100	100,00	100	100,00	100	100,00	100	100,00

**Tabela 16: Sumário por categoria de patologia/sustância
interferente para KLK-6**

		Melhor corte a partir do gráfico ROC		Média + 2*pad	
Grupo	Resultado	N	%	N	%
Tumores	Positivo	5	11,11	4	8,89
	Negativo	40	88,89	41	91,11
	Total	45	100,00	45	100,00
Distúrbio metabólico	Positivo	0	0,00	0	0,00
	Negativo	20	100,00	20	100,00
	Total	20	100,00	20	100,00
Flutuação hormonal	Positivo	0	0,00	0	0,00
	Negativo	33	100,00	33	100,00
	Total	33	100,00	33	100,00
Distúrbio ginecológico	Positivo	3	8,57	2	5,71
	Negativo	32	91,43	33	94,29
	Total	35	100,00	35	100,00
Distúrbio vascular	Positivo	3	12,00	1	4,00
	Negativo	22	88,00	24	96,00
	Total	25	100,00	25	100,00

Distúrbio imuno crônico	Positivo	2	4,76	1	2,38
	Negativo	40	95,24	41	97,62
	Total	42	100,00	42	100,00

Tabela 17: Sumário por grupo de estágio de câncer para KLK-

6

		Melhor corte a partir do gráfico ROC		Média + 2*pad	
Estágio	Resultado	N	%	N	%
1	Positivo	10	14,93	4	5,97
	Negativo	57	85,07	63	94,03
	Total	67	100,00	67	100,00
2	Positivo	7	10,61	3	4,55
	Negativo	59	89,39	63	95,45
	Total	66	100,00	66	100,00
3	Positivo	6	8,96	3	4,48
	Negativo	61	91,04	64	95,52
	Total	67	100,00	67	100,00

Biomarcador: KL-10

Tabela 18: Sumário por grupo de idade para KLK-10

		Melhor corte a partir do gráfico ROC				Média + 2*pad			
		Idade <=55		Idade >55		Idade <=55		Idade >55	
Grupo	Resultado	N	%	N	%	N	%	N	%
IP	Positivo	56	62,22	51	47,22	7	7,78	6	5,56
	Negativo	34	37,78	57	52,78	83	92,22	102	94,44
	Total	90	100,00	108	100,00	90	100,00	108	100,00
NORMAL	Positivo	92	45,77	89	45,64	4	1,99	2	1,03
	Negativo	109	54,23	106	54,36	197	98,01	193	98,97

	Total	201	100,00	195	100,00	201	100,00	195	100,00
OvCA	Positivo	63	63,00	53	53,00	9	9,00	7	7,00
	Negativo	37	37,00	47	47,00	91	91,00	93	93,00
	Total	100	100,00	100	100,00	100	100,00	100	100,00

**Tabela 19: Sumário por grupo de patologia/substância
interferente para KLK-10**

		Melhor corte a partir do gráfico ROC		Média + 2*pad	
Grupo	Resultado	N	%	N	%
Tumores	Positivo	28	62,22	3	6,67
	Negativo	17	37,78	42	93,33
	Total	45	100,00	45	100,00
Distúrbio metabólico	Positivo	10	50,00	0	0,00
	Negativo	10	50,00	20	100,00
	Total	20	100,00	20	100,00
Flutuação hormonal	Positivo	14	42,42	0	0,00
	Negativo	19	57,58	33	100,00
	Total	33	100,00	33	100,00
Distúrbio ginecológico	Positivo	23	65,71	3	8,57
	Negativo	12	34,29	32	91,43
	Total	35	100,00	35	100,00
Distúrbio vascular	Positivo	11	44,00	1	4,00
	Negativo	14	56,00	24	96,00
	Total	25	100,00	25	100,00
Distúrbio imuno crônico	Positivo	23	54,76	6	14,29
	Negativo	19	45,24	36	85,71
	Total	42	100,00	42	100,00

Tabela 20: Sumário por grupo de estágio de câncer para

KLK-10

		Melhor corte a partir do gráfico ROC		Média + 2*pad	
Estágio	Resultado	N	%	N	%
1	Positivo	37	55,22	8	11,94
	Negativo	30	44,78	59	88,06
	Total	67	100,00	67	100,00
2	Positivo	37	56,06	3	4,55
	Negativo	29	43,94	63	95,45
	Total	66	100,00	66	100,00
3	Positivo	42	62,69	5	7,46
	Negativo	25	37,31	62	92,54
	Total	67	100,00	67	100,00

Biomarcador: PAI-1

Tabela 21: Sumário por grupo de idade para PAI-1

		Melhor corte a partir do gráfico ROC				Média + 2*pad			
		Idade <=55		Idade >55		Idade <=55		Idade >55	
Grupo	Resultado	N	%	N	%	N	%	N	%
IP	Positivo	52	57,78	67	62,04	12	13,33	10	9,26
	Negativo	38	42,22	41	37,96	78	86,67	98	90,74
	Total	90	100,00	108	100,00	90	100,00	108	100,00
NORMAL	Positivo	43	21,39	52	26,67	5	2,49	10	5,13
	Negativo	158	78,61	143	73,33	196	97,51	185	94,87
	Total	201	100,00	195	100,00	201	100,00	195	100,00
OvCA	Positivo	71	71,00	62	62,00	19	19,00	11	11,00
	Negativo	29	29,00	38	38,00	81	81,00	89	89,00
	Total	100	100,00	100	100,00	100	100,00	100	100,00

Tabela 22: Sumário por grupo de patologia/substância

interferente para PAI-1

		Melhor corte a partir do gráfico ROC		Média + 2*pad	
Grupo	Resultado	N	%	N	%
Tumores	Positivo	17	37,78	4	8,89
	Negativo	28	62,22	41	91,11
	Total	45	100,00	45	100,00
Distúrbio metabólico	Positivo	16	80,00	4	20,00
	Negativo	4	20,00	16	80,00
	Total	20	100,00	20	100,00
Flutuação hormonal	Positivo	24	72,73	5	15,15
	Negativo	9	27,27	28	84,85
	Total	33	100,00	33	100,00
Distúrbio ginecológico	Positivo	17	48,57	2	5,71
	Negativo	18	51,43	33	94,29
	Total	35	100,00	35	100,00
Distúrbio vascular	Positivo	17	68,00	1	4,00
	Negativo	8	32,00	24	96,00
	Total	25	100,00	25	100,00
Distúrbio imuno crônico	Positivo	30	71,43	6	14,29
	Negativo	12	28,57	36	85,71
	Total	42	100,00	42	100,00

Tabela 23: Sumário por grupo de estágio de câncer para
PAI-1

		Melhor corte a partir do gráfico ROC		Média+2*pad	
Estágio	Resultado	N	%	N	%
1	Positivo	54	80,60	15	22,39

	Negativo	13	19,40	52	77,61
	Total	67	100,00	67	100,00
2	Positivo	33	50,00	4	6,06
	Negativo	33	50,00	62	93,94
	Total	66	100,00	66	100,00
3	Positivo	46	68,66	11	16,42
	Negativo	21	31,34	56	83,58
	Total	67	100,00	67	100,0

Biomarcador: CTHRC1

Tabela 24: Sumário por grupo de idade para CTHRC1

		Melhor corte a partir do gráfico ROC				Média + 2*pad			
		Idade <=55		Idade>55		Idade <=55		Idade>55	
Grupo	Resultado	N	%	N	%	N	%	N	%
IP	Positivo	12	13,33	35	32,41	6	6,67	11	10,19
	Negativo	78	86,67	73	67,59	84	93,33	97	89,81
	Total	90	100,00	108	100,00	90	100,00	108	100,00
NORMAL	Positivo	20	9,95	40	20,51	4	1,99	4	2,05
	Negativo	181	90,05	155	79,49	197	98,01	191	97,95
	Total	201	100,00	195	100,00	201	100,00	195	100,00
OvCA	Positivo	24	24,00	35	35,00	10	10,00	15	15,00
	Negativo	76	76,00	65	65,00	90	90,00	85	85,00
	Total	100	100,00	100	100,00	100	100,00	100	100,00

Tabela 25: Sumário por grupo de patologia/substância interferente para CTHRC1

		Melhor corte a partir do gráfico ROC		Média + 2*pad	
		N	%	N	%
Grupo	Resultado	N	%	N	%

Tumores	Positivo	13	28,89	7	15,56
	Negativo	32	71,11	38	84,44
	Total	45	100,00	45	100,00
Distúrbio metabólico	Positivo	2	10,00	0	0,00
	Negativo	18	90,00	20	100,00
	Total	20	100,00	20	100,00
Flutuação hormonal	Positivo	1	3,03	1	3,03
	Negativo	32	96,97	32	96,97
	Total	33	100,00	33	100,00
Distúrbio ginecológico	Positivo	2	5,71	0	0,00
	Negativo	33	94,29	35	100,00
	Total	35	100,00	35	100,00
Distúrbio vascular	Positivo	11	44,00	5	20,00
	Negativo	14	56,00	20	80,00
	Total	25	100,00	25	100,00
Distúrbio imuno crônico	Positivo	18	42,86	4	9,52
	Negativo	24	57,14	38	90,48
	Total	42	100,00	42	100,00

Tabela 26: Sumário por grupo de estágio de câncer para CTHRC1

		Melhor corte a partir do gráfico ROV		Média + 2*std	
Estágio	Resultado	N	%	N	%
1	Positivo	16	23,88	7	10,45
	Negativo	51	76,12	60	89,55
	Total	67	100,00	67	100,00
2	Positivo	19	28,79	8	12,12
	Negativo	47	71,21	58	87,88
	Total	66	100,00	66	100,00

3	Positivo	24	35,82	10	14,93
	Negativo	43	64,18	57	85,07
	Total	67	100,00	67	100,00

Biomarcador: SLPI

Tabela 27: Sumário por grupo de idade para SLPI

		Melhor corte a partir do gráfico ROC				Média + 2*pad			
		Idade <=55		Idade>55		Idade <=55		Idade>55	
		N	%	N	%	N	%	N	%
IP	Positivo	27	30,00	61	56,48	4	4,44	23	21,30
	Negativo	63	70,00	47	43,52	86	95,56	85	78,70
	Total	90	100,00	108	100,00	90	100,00	108	100,00
NORMAL	Positivo	49	24,38	63	32,31	4	1,99	3	1,54
	Negativo	152	75,62	132	67,69	197	98,01	192	98,46
	Total	201	100,00	195	100,00	201	100,00	195	100,00
OvCA	Positivo	53	53,00	67	67,00	14	14,00	16	16,00
	Negativo	47	47,00	33	33,00	86	86,00	84	84,00
	Total	100	100,00	100	100,00	100	100,00	100	100,00

Tabela 28: Sumário por Grupo de patologia/substância interferente para SLPI

		Melhor corte a partir do gráfico ROC		Média + 2*pad	
Grupo	Resultado	N	%	N	%
Tumores	Positivo	20	44,44	7	15,56
	Negativo	25	55,56	38	84,44
	Total	45	100,00	45	100,00
Distúrbio metabólico	Positivo	10	50,00	1	5,00
	Negativo	10	50,00	19	95,00

	Total	20	100,00	20	100,00
Flutuação hormonal	Positivo	6	18,18	0	0,00
	Negativo	27	81,82	33	100,00
	Total	33	100,00	33	100,00
Distúrbio ginecológico	Positivo	12	34,29	4	11,43
	Negativo	23	65,71	31	88,57
	Total	35	100,00	35	100,00
Distúrbio vascular	Positivo	16	64,00	9	36,00
	Negativo	9	36,00	16	64,00
	Total	25	100,00	25	100,00
Distúrbio imuno crônico	Positivo	26	61,90	7	16,67
	Negativo	16	38,10	35	83,33
	Total	42	100,00	42	100,00

Tabela 29: Sumário por grupo de estágio de câncer para SLPI

		Melhor corte a partir do gráfico ROC		Média + 2*pad	
Estágio	Resultado	N	%	N	%
1	Positivo	34	50,75	9	13,43
	Negativo	33	49,25	58	86,57
	Total	67	100,00	67	100,00
2	Positivo	38	57,58	4	6,06
	Negativo	28	42,42	62	93,94
	Total	66	100,00	66	100,00
3	Positivo	48	71,64	17	25,37
	Negativo	19	28,36	50	74,63
	Total	67	100,00	67	100,00

Biomarcador: Inibina A

Tabela 30: Sumário por grupo de idade para Inibina

		Melhor corte a partir do gráfico ROC				Média+2*pad			
		Idade <=55		Idade>55		Idade <=55		Idade>55	
Grupo	Resultado	N	%	N	%	N	%	N	%
IP	Positivo	53	58,89	11	10,19	48	53,33	7	6,48
	Negativo	37	41,11	97	89,81	42	46,67	101	93,52
	Total	90	100,00	108	100,00	90	100,00	108	100,00
NORMAL	Positivo	94	46,77	25	12,82	83	41,29	14	7,18
	Negativo	107	53,23	170	87,18	118	58,71	181	92,82
	Total	201	100,00	195	100,00	201	100,00	195	100,00
OvCA	Positivo	42	42,00	41	41,00	32	32,00	36	36,00
	Negativo	58	58,00	59	59,00	68	68,00	64	64,00
	Total	100	100,00	100	100,00	100	100,00	100	100,00

Tabela 31: Sumário por Grupo de patologia/substância interferente para Inibina

		Melhor corte a partir do gráfico ROC		Média + 2*pad	
Grupo	Resultado	N	%	N	%
Tumores	Positivo	4	8,89	2	4,44
	Negativo	41	91,11	43	95,56
	Total	45	100,00	45	100,00
Distúrbio metabólico	Positivo	8	40,00	8	40,00
	Negativo	12	60,00	12	60,00
	Total	20	100,00	20	100,00
Flutuação hormonal	Positivo	16	48,48	16	48,48
	Negativo	17	51,52	17	51,52
	Total	33	100,00	33	100,00
Distúrbio ginecológico	Positivo	27	77,14	25	71,43

	Negativo	8	22,86	10	28,57
	Total	35	100,00	35	100,00
Distúrbio vascular	Positivo	3	12,00	2	8,00
	Negativo	22	88,00	23	92,00
	Total	25	100,00	25	100,00
Distúrbio imuno crônico	Positivo	8	19,05	4	9,52
	Negativo	34	80,95	38	90,48
	Total	42	100,00	42	100,00

Tabela 32: Sumário por grupo de estágio de câncer para Inibina

		Melhor corte a partir de gráfico ROC		Média + 2*pad	
Estágio	Resultado	N	%	N	%
1	Positivo	25	37,31	20	29,85
	Negativo	42	62,69	47	70,15
	Total	67	100,00	67	100,00
2	Positivo	35	53,03	32	48,48
	Negativo	31	46,97	34	51,52
	Total	66	100,00	66	100,00
3	Positivo	23	34,33	16	23,88
	Negativo	44	65,67	51	76,12
	Total	67	100,00	67	100,00

Biomarcador: Glicodelina

Tabela 33: Sumário por grupo de idade para Glicodelina

		Melhor corte a partir do gráfico ROC				Média+2*pad			
		Idade <=55		Idade>55		Idade <=55		Idade>55	
Grupo	Resultado	N	%	N	%	N	%	N	%

IP	Positivo	53	58,89	18	16,67	36	40,00	10	9,26
	Negativo	37	41,11	90	83,33	54	60,00	98	90,74
	Total	90	100,00	108	100,00	90	100,00	108	100,00
NORMAL	Positivo	73	36,32	10	5,13	56	27,86	3	1,54
	Negativo	128	63,68	185	94,87	145	72,14	192	98,46
	Total	201	100,00	195	100,00	201	100,00	195	100,00
OvCA	Positivo	65	65,00	62	62,00	49	49,00	52	52,00
	Negativo	35	35,00	38	38,00	51	51,00	48	48,00
	Total	100	100,00	100	100,00	100	100,00	100	100,00

Tabela 34: Sumário por Grupo de patologia/substância interferente para Glicodelina

		Melhor corte a partir do gráfico ROC		Média + 2*pad	
Grupo	Resultado	N	%	N	%
Tumores	Positivo	13	28,89	6	13,33
	Negativo	32	71,11	39	86,67
	Total	45	100,00	45	100,00
Distúrbio metabólico	Positivo	9	45,00	5	25,00
	Negativo	11	55,00	15	75,00
	Total	20	100,00	20	100,00
Flutuação hormonal	Positivo	18	54,55	15	45,45
	Negativo	15	45,45	18	54,55
	Total	33	100,00	33	100,00
Distúrbio ginecológico	Positivo	21	60,00	14	40,00
	Negativo	14	40,00	21	60,00
	Total	35	100,00	35	100,00
Distúrbio vascular	Positivo	1	4,00	1	4,00
	Negativo	24	96,00	24	96,00

	Total	25	100,00	25	100,00
Distúrbio imunológico crônico	Positivo	9	21,43	5	11,90
	Negativo	33	78,57	37	88,10
	Total	42	100,00	42	100,00

Tabela 35: Sumário por grupo de estágio de câncer para Glicodelina

		Melhor corte a partir do gráfico ROC		Média + 2*pad	
Estágio	Resultado	N	%	N	%
1	Positivo	43	64,18	34	50,75
	Negativo	24	35,82	33	49,25
	Total	67	100,00	67	100,00
2	Positivo	41	62,12	37	56,06
	Negativo	25	37,88	29	43,94
	Total	66	100,00	66	100,00
3	Positivo	43	64,18	30	44,78
	Negativo	24	35,82	37	55,22
	Total	67	100,00	67	100,00

Biomarcador: MMP-7

Tabela 36: Sumário por grupo de idade para MMP-7

		Melhor corte a partir do gráfico ROC				Média+2*pad			
		Idade <=55		Idade>55		Idade <=55		Idade>55	
Grupo	Resultado	N	%	N	%	N	%	N	%
IP	Positivo	19	21,11	78	72,22	9	10,00	44	40,74
	Negativo	71	78,89	30	27,78	81	90,00	64	59,26
	Total	90	100,00	108	100,00	90	100,00	108	100,00
NORMAL	Positivo	12	5,97	30	15,38	2	1,00	7	3,59
	Negativo	189	94,03	165	84,62	199	99,00	188	96,41

	Total	201	100,00	195	100,00	201	100,00	195	100,00
OvCA	Positivo	50	50,00	53	53,00	28	28,00	33	33,00
	Negativo	50	50,00	47	47,00	72	72,00	67	67,00
	Total	100	100,00	100	100,00	100	100,00	100	100,00

Tabela 37: Sumário por Grupo de patologia/substância interferente para MMP-7

		Melhor corte a partir do gráfico ROC		Média + 2*pad	
Grupo	Resultado	N	%	N	%
Tumores	Positivo	27	60,00	15	33,33
	Negativo	18	40,00	30	66,67
	Total	45	100,00	45	100,00
Distúrbio metabólico	Positivo	8	40,00	5	25,00
	Negativo	12	60,00	15	75,00
	Total	20	100,00	20	100,00
Flutuação hormonal	Positivo	3	9,09	0	0,00
	Negativo	30	90,91	33	100,00
	Total	33	100,00	33	100,00
Distúrbio ginecológico	Positivo	8	22,86	3	8,57
	Negativo	27	77,14	32	91,43
	Total	35	100,00	35	100,00
Distúrbio vascular	Positivo	22	88,00	10	40,00
	Negativo	3	12,00	15	60,00
	Total	25	100,00	25	100,00
Distúrbio imuno crônico	Positivo	29	69,05	20	47,62
	Negativo	13	30,95	22	52,38
	Total	42	100,00	42	100,00

Tabela 38: Sumário por grupo de estágio de câncer para

MMP-7

		Melhor corte a partir do gráfico ROC		Média + 2*pad	
Estágio	Resultado	N	%	N	%
1	Positivo	33	49,25	20	29,85
	Negativo	34	50,75	47	70,15
	Total	67	100,00	67	100,00
2	Positivo	28	42,42	11	16,67
	Negativo	38	57,58	55	83,33
	Total	66	100,00	66	100,00
3	Positivo	42	62,69	30	44,78
	Negativo	25	37,31	37	55,22
	Total	67	100,00	67	100,00

Biomarcador: PLAU-R

Tabela 39: Sumário por grupo de idade para PLAU-R

		Melhor corte a partir do gráfico ROC				Média + 2*pad			
		Idade <=55		Idade >55		Idade <=55		Idade >55	
Grupo	Resultado	N	%	N	%	N	%	N	%
IP	Positivo	50	55,56	71	65,74	24	26,67	56	51,85
	Negativo	40	44,44	37	34,26	66	73,33	52	48,15
	Total	90	100,00	108	100,00	90	100,00	108	100,00
NORMAL	Positivo	35	17,41	61	31,28	16	7,96	23	11,79
	Negativo	166	82,59	134	68,72	185	92,04	172	88,21
	Total	201	100,00	195	100,00	201	100,00	195	100,00
OvCA	Positivo	71	71,00	72	72,00	44	44,00	50	50,00
	Negativo	29	29,00	28	28,00	56	56,00	50	50,00
	Total	100	100,00	100	100,00	100	100,00	100	100,00

Tabela 40: Sumário por Grupo de patologia/substância

interferente para PLAU-R 10

		Melhor corte a partir do gráfico ROC		Média + 2*pad	
Grupo	Resultado	N	%	N	%
Tumores	Positivo	30	66,67	20	44,44
	Negativo	15	33,33	25	55,56
	Total	45	100,00	45	100,00
Distúrbio metabólico	Positivo	13	65,00	11	55,00
	Negativo	7	35,00	9	45,00
	Total	20	100,00	20	100,00
Flutuação hormonal	Positivo	13	39,39	1	3,03
	Negativo	20	60,61	32	96,97
	Total	33	100,00	33	100,00
Distúrbio ginecológico	Positivo	15	42,86	9	25,71
	Negativo	20	57,14	26	74,29
	Total	35	100,00	35	100,00
Distúrbio vascular	Positivo	18	72,00	11	44,00
	Negativo	7	28,00	14	56,00
	Total	25	100,00	25	100,00
Distúrbio imuno crônico	Positivo	32	76,19	28	66,67
	Negativo	10	23,81	14	33,33
	Total	42	100,00	42	100,00

Tabela 41: Sumário por grupo de estágio de câncer para
PLAU-R

		Melhor corte a partir do gráfico ROC		Média + 2*pad	
Estágio	Resultado	N	%	N	%
1	Positivo	53	79,10	30	44,78

	Negativo	14	20,90	37	55,22
	Total	67	100,00	67	100,00
2	Positivo	40	60,61	29	43,94
	Negativo	26	39,39	37	56,06
	Total	66	100,00	66	100,00
3	Positivo	50	74,63	35	52,24
	Negativo	17	25,37	32	47,76
	Total	67	100,00	67	100,00

Biomarcador: Prolactina

Tabela 42: Sumário por grupo de idade para Prolactina

		Melhor corte a partir do gráfico ROC				Média + 2*pad			
		Idade <=55		Idade>55		Idade <=55		Idade>55	
Grupo	Resultado	N	%	N	%	N	%	N	%
IP	Positivo	50	55,56	49	45,37	9	10,00	6	5,56
	Negativo	40	44,44	59	54,63	81	90,00	102	94,44
	Total	90	100,00	108	100,00	90	100,00	108	100,00
NORMAL	Positivo	92	45,77	54	27,69	6	2,99	3	1,54
	Negativo	109	54,23	141	72,31	195	97,01	192	98,46
	Total	201	100,00	195	100,00	201	100,00	195	100,00
OvCA	Positivo	64	64,00	48	48,00	5	5,00	2	2,00
	Negativo	36	36,00	52	52,00	95	95,00	98	98,00
	Total	100	100,00	100	100,00	100	100,00	100	100,00

Tabela 43: Sumário por Grupo de patologia/substância interferente para Prolactina

		Melhor corte a partir do gráfico ROC				Média + 2*pad	
Grupo	Resultado	N	%	N	%	N	%

Tumores	Positivo	17	37,78	3	6,67
	Negativo	28	62,22	42	93,33
	Total	45	100,00	45	100,00
Distúrbio metabólico	Positivo	4	20,00	2	10,00
	Negativo	16	80,00	18	90,00
	Total	20	100,00	20	100,00
Flutuação hormonal	Positivo	23	69,70	4	12,12
	Negativo	10	30,30	29	87,88
	Total	33	100,00	33	100,00
Distúrbio ginecológico	Positivo	18	51,43	3	8,57
	Negativo	17	48,57	32	91,43
	Total	35	100,00	35	100,00
Distúrbio vascular	Positivo	13	52,00	2	8,00
	Negativo	12	48,00	23	92,00
	Total	25	100,00	25	100,00
Distúrbio imuno crônico	Positivo	26	61,90	2	4,76
	Negativo	16	38,10	40	95,24
	Total	42	100,00	42	100,00

**Tabela 44: Sumário por grupo de estágio de câncer para
Prolactina**

		Melhor corte a partir do gráfico ROC		Média + 2*pad	
Estágio	Resultado	N	%	N	%
1	Positivo	42	62,69	2	2,99
	Negativo	25	37,31	65	97,01
	Total	67	100,00	67	100,00
2	Positivo	30	45,45	2	3,03
	Negativo	36	54,55	64	96,97

	Total	66	100,00	66	100,00
3	Positivo	40	59,70	3	4,48
	Negativo	27	40,30	64	95,52
	Total	67	100,00	67	100,00

Biomarcador: CA125 (Lab Corp data)

Tabela 45: Sumário por grupo de idade para CA125 (LabCorp Data)

		Corte em 35			
		Idade <=55		Idade >55	
Grupo	Resultado	N	%	N	%
IP	Positivo	13	14,94	6	5,66
	Negativo	74	85,06	100	94,34
	Total	87	100,00	106	100,00
NORMAL	Positivo	5	2,51	1	0,52
	Negativo	194	97,49	193	99,48
	Total	199	100,00	194	100,00
OvCA	Positivo	39	39,39	60	60,61
	Negativo	60	60,61	39	39,39
	Total	99	100,00	99	100,00

Tabela 46: Sumário por Grupo de patologia/substância interferente para CA125 (LabCorp data)

5

		Corte em 35	
Grupo	Resultado	N	%
Tumores	Positivo	5	11,11
	Negativo	40	88,89
	Total	45	100,00
Distúrbio metabólico	Positivo	1	5,56
	Negativo	17	94,44

	Total	18	100,00
Flutuação hormonal	Positivo	7	21,21
	Negativo	26	78,79
	Total	33	100,00
Distúrbio ginecológico	Positivo	4	12,50
	Negativo	28	87,50
	Total	32	100,00
Distúrbio vascular	Positivo	0	0,00
	Negativo	25	100,00
	Total	25	100,00
Distúrbio imuno crônico	Positivo	2	4,76
	Negativo	40	95,24
	Total	42	100,00

**Tabela 47: Sumário por grupo de estágio de câncer para CA
125 (LabCorp data)**

		Corte em 35	
Estágio	Resultado	N	%
1	Positivo	24	35,82
	Negativo	43	64,18
	Total	67	100,00
2	Positivo	37	56,06
	Negativo	29	43,94
	Total	66	100,00
3	Positivo	38	58,46
	Negativo	27	41,54
	Total	65	100,00

Os sumários da sensibilidade de treze biomarcadores analisados são apresentados nas Tabelas 48-50, com base em
5 estágio de tumor, limites de desvio padrão-2 normais, ou

"melhor ajuste", respectivamente.

Tabela 48: Sumário de sensibilidade de marcador individual por estágio de tumor (com base no melhor corte)

Marcador	Estágio 1 %pos	Estágio 2 % pos	Estágio 3 %pos
HE4	85,1	80,3	92,5
Glicodelina	64,2	62,1	64,2
MMP7	49,3	42,4	62,7
SLPI	50,8	57,6	71,6
PAI-1	80,6	50,0	68,7
MUC-1	65,7	40,9	55,2
CA125	35,8	56,1	58,5
Plau-R	79,1	60,6	74,6
Inibina A	37,3	53,0	34,3
CTHRC1	23,9	28,8	35,8
KLK6	14,9	10,6	9,0
KLK10	55,2	56,1	62,7
Prolactina	62,7	45,5	59,7

Tabela 49: Sumário de sensibilidade de marcador Individual (baseado em limite Normal 2SD)

5

Marcador	Sensibilidade	Especificidade
HE4	66,5	96
Glicodelina	50,5	85,3
MMP7	30,5	97,7
SLPI	15,0	98,3
Marcador	sensibilidade	especificidade
Plau-R	47,0	90,1
MUC1	8,0	98,5
Inibina A	34,0	75,8
PAI-1	15,0	96,2

CA125 (≥ 35 u/ml)	50,0	98,5
CTHRC1	12,5	98,0
KLK6	5,0	98,2
KLK10	8,0	98,5
Prolactina	3,5	97,7

**Tabela 50: Sumário de sensibilidade de marcador Individual
(baseado no melhor corte)**

Marcador	Sensibilidade	Especificidade
HE4	86,0	86,3
Glicodelina	63,5	79,0
MMP7	51,5	89,4
SLPI	60,0	71,7
Plau-R	71,5	77,2
MUC1	54,0	73,0
Inibina A	40,7	70,3
PAI-1	66,5	76,0
CA125 (≥ 35 u/ml)	50,5	98,2
CTHRC1	29,5	84,8
KLK6	11,5	95,7
KLK10	58,0	54,3
Prolactina	56,0	63,1

**Exemplo 3: Estudo de seleção de biomarcador de ovário -
análise de biomarcadores múltiplos**

5 O método de regressão logística foi utilizado para
seleção de biomarcadores ótimos para esse estudo.
Utilizando regressão logística, a seleção escalonada inicia
descobrendo o biomarcador que produz o maior valor
quadrado-R com a variável dependente. A seguir, dado que o
10 "melhor" biomarcador está no modelo, a regressão logística

verifica o melhor biomarcador seguinte em termos de adição ao quadrado-R. Esse processo de descobrir um conjunto de biomarcadores que adiciona ao quadrado-R é parado quando biomarcadores não mais podem adicionar ao quadrado-R, de acordo com certos critérios estatísticos. Esses conjuntos de biomarcadores não são exclusivos porque alguns dos biomarcadores têm o mesmo desempenho predizível.

Com base em um modelo selecionado, um gráfico ROC pode ser produzido, o qual provê a relação entre as taxas de sensibilidade e especificidade. Portanto, uma especificidade e sensibilidade apropriadas podem ser escolhidas para se obter um PPV esperado com sensibilidade aceita.

As Tabelas 51 e 52 fornecem vários exemplos que envolvem a seleção de um conjunto de biomarcadores com uma especificidade mais elevada e uma sensibilidade apropriada com um PPV de aproximadamente 10% e uma taxa de sensibilidade combinada em torno de 70% - 80% sob a assunção de que a população é de 8.000.000 e a prevalência de doença é 0,25%. Valores alvo diferentes para sensibilidade, especificidade, NPV e PPV podem ser obtidos por seleção de diferentes cortes de ensaio, diferentes combinações de biomarcador, e diferentes regras para combinar os biomarcadores. O desempenho de biomarcador foi analisado utilizando os valores de biomarcador como variáveis contínuas (Tabela 51) e como variáveis categóricas (Tabela 52).

Como definição, quando duas etapas de ensaio são executadas, a primeira etapa de ensaio pode ser mencionada como o "teste de triagem" e a segunda etapa pode ser

5 mencionada como o "teste de reflexo." "Melhor ponto de corte" se refere ao valor obtido a partir do gráfico ROC para um biomarcador específico que produz a melhor sensibilidade e especificidade. "Média+2*pad" se refere ao nível de expressão média mais duas vezes o desvio padrão, com base em análise de amostras normais a partir de pacientes que não apresentam câncer de ovário.

Desempenho de biomarcador com variáveis contínuas

Tabela 51: Sensibilidade, especificidade, PPV e NPV estimados, ajustados por prevalência de doença para modelos diferentes (valores de biomarcador como variáveis contínuas)

Exemplo	Marcador selecionado e regra	Teste de triagem/reflexo sensibilidade	Teste de triagem/reflexo especificidade	Desempenho combinado*			
				Sensibilidade	Especificidade	PPV	NPV
Idade >55							
1	Teste de triagem: Se $HE4 \leq 1,8$ então o teste é negativo Teste de Reflexo: Se $HE4 > 1,8$ então o seguinte marcador selecionado: CA125, GLY, PAI, Plau-R (valor efetivo usado**)	90,2%	62,2%	78,474%	98,4880%	11,5105%	99,9453%

para obter os valores para sensibilidade, especificidade, PPV e NPV indicados na tabela

Tabela 52: Sensibilidade, especificidade, PPV e NPV estimados para prevalência de doença para modelos diferentes (valores de biomarcador como variáveis categóricas)

Exemplo	Marcador selecionado e regra	Teste de triagem/reflexo sensibilidade	Teste de triagem/reflexo especificidade	Desempenho combinado*			
				Sensibilidade	especificidade	ppv	NPV
Amostra geral							
1	Teste de triagem: Se HE4<=1,8 então o teste é negativo Teste de reflexo: Se HE4>1,8 então o seguinte marcador selecionado: CA125, MUC1, GLY, PAI-1, Plau-R (melhores pontos de corte usados)	91,9%	73%	98,704%	12,4479%	99,9328%	
Idade > 55							

1	Teste de triagem: Se $HE4 \leq 1,8$ então o teste é negativo Teste de Reflexo: Se $HE4 > 1,8$ então o seguinte marcador selecionado (melhores pontos de corte usados): CA125, MUC-1, MMP-7,	90,2%	62,2%	70,356%	98,4502%	10,2154%	99,9246%
Exemplo	Marcador selecionado e regra Plau-R, GLY	Teste de triagem/reflexo sensibilidade 90,2% 82%	Teste de triagem/reflexo especificidade 62,2% 95,8%	Desempenho combinado*			
				Sensibilidade	especificidade	PPV	NPV
2	Teste de triagem: Se $HE4 \leq 1,8$ então o teste é negativo Teste de reflexo: Se $HE4 > 1,8$ então o seguinte	90,2% 82%	62,2% 95,8%	73,964%	98,4124%	10,4555%	99,9337%

	marcador selecionado (média + 2*std pontos de corte usados): CA125, MUC-1, MMP-7, Plau-R, Inibina							
3t	Marcador selecionado: PLAU-R, GLY, HE4, CA125, MMP-7, PAI-1 (Melhores pontos de corte usados)	80,8%	98,5%	80,8%	98,5%	98,5%	11,8946%	99,9512%
4t	Marcador selecionado: PLAU-R, GLY, HE4, CA125, MMP-7 (Média+2*std pontos de corte usados)	75%	99%	75%	99%	99%	15,8228%	99,9368%

*: CA125 corte >= 35 em quaisquer casos de melhor corte ou média+2std

** Considere a população = 8.000.000; prevalência = 0,25%, casos estimados de câncer = 20.000 na população.

t embora todos os biomarcadores listados fossem ensaiados em uma etapa única, algoritmos adicionais foram aplicados para obter os valores para sensibilidade, especificidade, PPV e NPV indicados na tabela

Resultados de sensibilidade, especificidade, PPV e NPV obtidos com aplicação de "regras de teste"

No estudo atual, os biomarcadores HE4, CA125, PLAU-R, glicodelina, Muc-1, PAI-1, MMP-7, e inibina foram os marcadores mais freqüentemente selecionados com base em desempenho de marcador como variáveis contínuas ou categóricas. Em contraste com os métodos estatísticos descritos acima, a Tabela 53 fornece a sensibilidade, especificidade, PPV e NPV estimados (ajustados pela prevalência da doença) com base em duas regras de teste: (1) se quaisquer dois dos biomarcadores acima forem positivos (isto é, superexpressos), então o teste é declarado positivo ou (2) se quaisquer 3 dos biomarcadores acima forem positivos (isto é, superexpressos), o teste é declarado positivo. Contrário aos resultados apresentados acima nas Tabelas 51 e 52, no entanto, a aplicação de qualquer regra de teste não produziu uma taxa de especificidade elevada, que por sua vez leva a um PPB inaceitavelmente baixo (<1,5%) quando ajustado para a taxa de prevalência baixa de câncer do ovário. A aplicação de "regras de teste," como aquelas descritas aqui, é representativa do estado atual da técnica na identificação de pacientes com risco aumentado de câncer do ovário.

Tabela 53: Sensibilidade, especificidade, PPV e NPV estimados ajustados por prevalência de doença com base em regras de teste

Ex.	Marcador selecionado e regra	Desempenho*			
		Sensibi- lidade	Especifi- cidade	PPV	NPV

Amostra geral					
1	Quaisquer dos dois seguintes marcadores são positivos: HE4, CA125, Plau-R, GLY, MUC-1, PAI-1, MMP-7, Inibina (melhores pontos de corte usados)	97,475%	51,654%	0,5028%	99,9878%
2	Quaisquer dos 3 seguintes marcadores são positivos: HE4, CA125, Plau-R, GLY, MUC-1, PAI-1, MMP-7, Inibina (melhores pontos de corte usados)	91,414%	78,372%	1,0482%	99,9726%
Idade >55 anos de idade					
1	Quaisquer dos dois seguintes marcadores são positivos: HE4, CA125, Plau-R, GLY, MUC-1, PAI-1, MMP-7, Inibina (melhores pontos de corte usados)	96,970%	56,186%	0,5516%	99,9865%

2	Quaisquer dos 3 marcadores seguintes são positivos: HE4, CA125, Plau-R, GLY, MUC-1, PAI-	94,949%	78,866%	1,1135%	99,9840%
Ex.	Marcador selecionado e regra	Desempenho*			
		Sensibilidade	Especificidade	PPV	NPV
	L, MMP-7, Inibina (melhores pontos de corte usados)				
* CA125 corte ≥ 35 em quaisquer casos de melhor corte ou média + 2pad ** Considere a população = 8.000.000; prevalência = 0,25%, casos estimados de câncer = 20.000 na população.					

Exemplo 4: Estudo de seleção de biomarcador de ovário - Análise de múltiplos biomarcadores utilizando método de triagem de uma etapa

A expressão dos biomarcadores HE4, CA125 e glicodelina e combinações dos mesmos para todas as pacientes e a idade das pacientes sendo acima de 55 anos, foi avaliada utilizando um método de triagem de uma etapa, como descrito acima. Em particular, a Tabela 54 provê os resultados para um algoritmo de uma etapa para pacientes acima de 55 anos de idade. O algoritmo de teste se baseou em um modelo de regressão logística linear, e o valor efetivo de cada marcador foi utilizado no modelo. Modelos

de regressão logística linear (e outros algoritmos) são rotineiros e bem conhecidos na técnica. Vide, por exemplo, Fleiss (2003) *Statistical Methods for rates and Proportions* (3ª ed.), que é aqui incorporado a título de referência na íntegra. O algoritmo ofereceu 76,8% de sensibilidade em 96,4% de especificidade. Um resultado de teste definido como positivo foi baseado no seguinte modelo de regressão logística linear: $\ln(P/(1-P)) = -4,2391 + -0,0888*CA125 + 0,1790*HE4 + 0,2349*GLY$, onde P é a probabilidade condicional de câncer de ovário, CA125, HE4 e glicodelina sendo dados como superexpressos na amostra de sangue da paciente. Um resultado similar foi obtido com CA125 determinado utilizando o valor de corte recomendado de fabricação de ≥ 35 u/mL.

Tabela 54: Sensibilidade e especificidade de ensaio de triagem de etapa única para distinguir câncer de ovário (todos os estágios) a partir de controles em pacientes acima de 55 anos de idade

Marcador	Variável	Algoritmo	Sensibili dade	Especific idade
HE4, CA125, GLICODELINA	Valor efetivo	1 etapa: baseado em modelo logístico linear	76,8%	96,4%
HE4, CA125, GLICODELINA	Valor efetivo, exceto CA125	1 etapa: baseado em modelo logístico linear	71,4%	95,4%

Exemplo 5: Método de análise de auto-realização

Validação de métodos de estudo

Um método de análise de auto-realização também foi realizado para assegurar uma estimativa robusta de

sensibilidade e especificidade para os estudos acima dado que um conjunto de soros de câncer único e independente não estava disponível para validar o modelo. O método de auto-realização consistiu em criar artificialmente 1000 conjuntos de dados aleatórios com seleção de substituição a partir do conjunto de amostra de estudo. Um conjunto dos marcadores mais freqüentemente selecionados no estudo com base em desempenho ótimo foi selecionado: HE4, CA125, PLAU-R, glicodelina, MUC1 e PAI-1. Um "teste" foi definido como a seguir: o teste é positivo se (1) HE4 for positivo e qualquer um entre CA125, Glicodelina, MMP-7, PLAU-4 for positivo ou (2) HE4 for negativo porém CA125, Glicodelina, MMP-7, PLAU-R forem todos positivos; de outro modo, o "teste" é negativo. A partir das 1000 amostras aleatórias, o desvio padrão/médio e 95% de intervalo de confiança da sensibilidade/especificidade desse teste definido foram obtidos.

Tabela 55: Informações de sequência de biomarcador

Nome do biomarcador	Sequência de aminoácidos		Sequência de Nucleotídeos	
	Nº de acesso	Identificador de sequência	Nº de acesso	Identificador de sequência
HE4 (Isoforma 1)	NP 006094	SEQ ID NO:1	NM 006103	SEQ ID NO:2
HE4 (Isoforma 3)	NP 542771	SEQ ID NO:3	NM 080733	SEQ ID NO:4
HE4 (Isoforma 4)	NP 542772	SEQ ID NO:5	NM 080734	SEQ ID NO:6
HE4 (Isoforma 2)	NP 542774	SEQ ID NO:7	NM 080736	SEQ ID NO:8
HE4 (Isoforma 5)	NP 542773	SEQ ID NO:9	NM 080735	SEQ ID NO:10
KLK6 (Variante A)	NP 002765	SEQ ID NO:11	NM 002774	SEQ ID NO:12
KLK6 (Variante B)	NP 001012982	SEQ ID NO:13	NM 001012964	SEQ ID NO:14
KLK6 (Variante C)	NP 001012983	SEQ ID NO:15	NM 001012965	SEQ ID NO:16
KLK (Variante D)	NP 001012984	SEQ ID NO:17	NM 001012966	SEQ ID NO:18

KLK10 (Variante 1)	NP 002767	SEQ ID NO:19	NM 002776	SEQ ID NO:20
KLK10 (Variante 2)	NP 665895	SEQ ID NO:21	NM 145888	SEQ ID NO:22
Glicodelina (Variante D	NP 001018059	SEQ ID NO:23	NM 001018409	SEQ ID NO:24
Glicodelina (Variante 2)	NP 002562	SEQ ID NO:25	NM 002571	SEQ ID NO:26
PAI-1	NP 000593	SEQ ID NO:27	NM 000602	SEQ ID NO:28
Muc-1 (Variante 1)	NP 002447	SEQ ID NO:29	NM 002456	SEQ ID NO:30
Muc-1 (Variante 2)	NP 001018016	SEQ ID NO:31	NM 001018016	SEQ ID NO:32
Muc-1 (Variante 3)	NP 001018017	SEQ ID NO:33	NM 001018017	SEQ ID NO:34
Muc-1 (Variante 4)	NP 001018021	SEQ ID NO:35	NM 001018021	SEQ ID NO:36
Alf-1 anti- tripsina	NP 000286	SEQ ID NO:37	NM 000295	SEQ ID NO:38
Alfa-1 anti- tripsina	NP 001002235	SEQ ID NO:39	NM 001002235	SEQ ID NO:40
Alfa-1 anti- tripsina	NP 001002236	SEQ ID NO:41	NM 001002236	SEQ ID NO:42
PLAUR (Variante 1)	NP 002650	SEQ ID NO:43	NM 002659	SEQ ID NO:44
PLAUR (Variante 2)	NP 001005376	SEQ ID NO:45	NM 001005376	SEQ ID NO:46
PLAUR (Variante 3)	NP 001005377	SEQ ID NO:47	NM 001005377	SEQ ID NO:48

CTHRC1	NP 612464	SEQ ID NO:49	NM 138455	SEQ ID NO:50
Inibina (INHA)	NP 002182	SEQ ID NO:51	NM 002191	SEQ ID NO:52
Inibina (LNHBB)	NP 002184	SEQ ID NO:53	NM 002193	SEQ ID NO:54
Inibina (INHBA)	NP 002183	SEQ ID NO:55	NM 002192	SEQ ID NO:56
CA125 (Muc-16)	NP 078966	SEQ ID NO:57	NM 024690	SEQ ID NO:58
MMP-7	NP 002414	SEQ ID NO:59	NM 002423	SEQ ID NO:60
Prolactina	NP 000939	SEQ ID NO:61	NM 000948	SEQ ID NO:62
SLPi	NP 003055	SEQ ID NO:63	NM 003064	SEQ ID NO:64

Todas as publicações e pedidos de patente mencionados no relatório descritivo são indicativos do nível daqueles versados na técnica à qual a presente invenção se refere. Todas as publicações e pedidos de patente são aqui
5 incorporados a título de referência até o mesmo ponto como se cada publicação ou pedido de patente individual fosse específica e individualmente indicado como sendo incorporado a título de referência.

Embora a invenção acima tenha sido descrita em algum
10 detalhe como ilustração e exemplo para fins de clareza e compreensão, será óbvio que certas alterações e modificações podem ser postas em prática compreendidas no escopo das modalidades apenas.

REIVINDICAÇÕES

1. Método de triagem para identificar pacientes com probabilidade aumentada de terem câncer de ovário, o método caracterizado por compreender:

- 5 a) executar uma primeira etapa de ensaio compreendendo detectar a expressão de um primeiro biomarcador ou primeiro painel de biomarcadores em uma amostra de sangue e determinar se o primeiro biomarcador ou o primeiro painel de biomarcadores é superexpresso; e
- 10 b) executar uma segunda etapa de ensaio se o primeiro biomarcador ou o primeiro painel de biomarcadores for determinado como sendo superexpresso na etapa (a), a segunda etapa de ensaio compreendendo detectar a expressão de um segundo biomarcador ou um segundo painel de
- 15 biomarcadores na amostra do corpo e determinar se o segundo biomarcador ou segundo painel de biomarcadores é superexpresso;

em que a superexpressão de ambos os primeiro e segundo biomarcadores ou painéis de biomarcadores é

20 indicativa de probabilidade aumentada da paciente ter câncer de ovário.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que as pacientes identificadas como tendo probabilidade aumentada de terem câncer de

25 ovário são submetidas a teste de diagnóstico adicional para determinar se a paciente tem câncer de ovário, em que o teste de diagnóstico adicional é selecionado a partir do grupo que consiste em exame pélvico, ultra-som transvaginal, varredura CT, MRI, laparotomia, laparoscopia,

30 e biópsia de amostra de tecido.

3. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que as pacientes identificadas como tendo probabilidade aumentada de terem câncer de ovário que são determinadas como não tendo atualmente
5 câncer de ovário são adicionalmente monitoradas em uma base regular em relação ao desenvolvimento de câncer de ovário.

4. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o método é utilizado para detectar câncer de ovário em estágio inicial.

10 5. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que um nível de expressão limite para cada biomarcador é determinado pela análise de um gráfico de Característica operacional de receptor (ROC) para cada biomarcador, em que um nível de expressão acima
15 de um nível limite indica que um biomarcador específico é superexpresso.

6. Método, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que o nível de expressão limite para cada biomarcador é determinado em relação ao nível de
20 expressão e uma população de pacientes normais.

7. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que as pacientes classificadas de acordo com o método da reivindicação 1 são assintomáticas e têm histórico familiar de câncer de ovário
25 ou fatores de risco clínico indicando alto risco de desenvolver câncer ovário.

8. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o método de triagem é executado em uma população de pacientes do sexo feminino
30 pós-menopausa.

9. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a amostra do corpo é uma amostra de soro ou sangue.

10. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a expressão dos primeiro e segundo biomarcadores ou painéis de biomarcadores é detectada no nível de proteína utilizando anticorpos.

11. Método, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que a expressão das primeira e segunda proteínas de biomarcador ou painéis de proteínas de biomarcador é detectada utilizando um formato ELISA ou um imunoensaio baseado em conta múltiplex.

12. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a expressão dos primeiro e segundo biomarcadores ou painéis de biomarcadores é detectada no nível de ácido nucléico utilizando RT-PCR.

13. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que os biomarcadores são selecionados a partir do grupo que consiste em HE4, CA125, glicodelina, MMP-7, Muc-1, PAI-1, CTHRC1, inibina A, PLAU-R, prolactina, KLK-10, KLK-6, SLPI, e alfa-1 antitripsina.

14. Método, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que os biomarcadores são selecionados a partir do grupo que consiste em CA125, HE4, glicodelina, MMP-7, SLPI, PLAU-R, Muc-1, inibina A e PAI=1.

15. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a sensibilidade da primeira etapa de ensaio é pelo menos aproximadamente 85%, e em que a especificidade da primeira etapa de ensaio é pelo menos aproximadamente 75%.

16. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a sensibilidade da segunda etapa de ensaio é pelo menos aproximadamente 80%, e em que a especificidade da segunda etapa de ensaio é pelo menos
5 aproximadamente 85%.

17. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a sensibilidade combinada das primeira e segunda etapas de ensaio é pelo menos aproximadamente 70%, e em que a especificidade combinada
10 dos primeiro e segundo testes de triagem é pelo menos aproximadamente 95%.

18. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o valor predizível negativo (NPV) do método de triagem combinado compreendendo as
15 primeira e segunda etapas de ensaio é pelo menos aproximadamente 99%.

19. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o PPV é pelo menos aproximadamente 8%.

20. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o teste de triagem combinado compreendendo a primeira e segunda etapa de ensaio tem uma sensibilidade de pelo menos aproximadamente 90%, uma especificidade de pelo menos aproximadamente 98%, um NPV de
25 pelo menos aproximadamente 99,9% e um PPV de pelo menos aproximadamente 10%.

21. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o biomarcador é HE4 e o segundo painel de biomarcadores é selecionado a partir do
30 grupo que consiste em um painel que compreende CA125,

glicodelina, Muc-1, PAI-1, e PLAU-R, um painel compreendendo CA125 e PAI-1, um painel compreendendo CA125, glicodelina, PAI-1 e MMP-7, um painel compreendendo CA125, glicodelina, PAI-1, e PLAU-R, um painel compreendendo
5 CA125, glicodelina, PAI-1, e PLAU-4, um painel compreendendo glicodelina, Muc-1, PLAU-R, e inibina A, um painel compreendendo CA125, Muc-1, glicodelina, PAI-1, e PLAU-R e um painel compreendendo CA125, MMP-7, glicodelina e PLAU-R.

10 22. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o método de triagem é executado em um modo automatizado, semi-automatizado ou manual.

15 23. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a primeira e segunda etapa de ensaio são executadas como um teste único ou como testes individuais, em que a primeira etapa de ensaio compreende um primeiro teste, e em que a segunda etapa de ensaio compreende um segundo teste.

20 24. Método de triagem para identificar pacientes com probabilidade aumentada de terem câncer de ovário, o método caracterizado por compreender:

a) detectar a expressão de uma pluralidade de biomarcadores em uma amostra de corpo; e

25 b) aplicar um modelo matemático aos dados de nível de expressão de biomarcador para identificar pacientes com probabilidade aumentada de terem câncer de ovário.

30 25. Método, de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que o modelo matemático é

selecionado do grupo que consiste em um modelo de regressão escalonada logística para seleção dos melhores biomarcadores e a curva de característica operacional de recepção (ROC) utilizada para seleção de um melhor ponto de corte para um biomarcador.

26. Método, de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que o método é utilizado para detectar câncer de ovário em estágio inicial.

27. Método, de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que as pacientes classificadas são assintomáticas e têm histórico familiar de câncer de ovário ou fatores de risco clínico indicando alto risco de desenvolver câncer de ovário.

28. Método, de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que o método de triagem é executado em uma população de pacientes do sexo feminino pós-menopausa.

29. Método, de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que a amostra do corpo é uma amostra de sangue ou soro.

30. Método, de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que a pluralidade de biomarcadores é selecionada do grupo que consiste em HE4, CXA125, glicodelina, MMP-7, Muc-1, PAI-1, CTHRC1, inibina A, PLAU-R, prolactina, KLK-10, KLK-6, SLPI e alfa-1 antitripsina.

31. Método, de acordo com a reivindicação 30, caracterizado pelo fato de que a pluralidade de biomarcadores é selecionada do grupo que consiste em HE4, CA125, e glicodelina.

32. Método de triagem de etapa única para identificar pacientes com probabilidade aumentada de terem câncer de ovário, o método caracterizado por compreender detectar a expressão de pelo menos três biomarcadores selecionados do grupo que consiste em HE4, CA125, glicodelina, MMP-7, Muc-1, PAI-1, CTHRC1, inibina A, PLAU-R, prolactina, KLK-10, KLK-6, SLPI, e alfa-1 antitripsina, glicodelina, HE4 e CA125 em uma amostra de corpo, em que a superexpressão de pelo menos um dos biomarcadores é indicativa da paciente ter probabilidade aumentada da paciente ter câncer de ovário.

33. Método, de acordo com a reivindicação 32, caracterizado pelo fato de que a superexpressão de pelo menos um dos biomarcadores selecionados a partir do grupo que consiste em HE4, glicodelina e CA125 é indicativo da probabilidade aumentada da paciente ter câncer de ovário.

34. Kit caracterizado por compreender uma pluralidade de anticorpos, em que cada um dos anticorpos liga-se especificamente a uma proteína de biomarcador distinta que é seletivamente superexpressa em câncer de ovário, em que as proteínas de biomarcador são selecionadas a partir do grupo que consiste em HE4, CA125, glicodelina, MMP-7, Muc-1, PAI-1, CTHRC1, inibina A, PLAU-R, prolactina, KLK-10, KLK-6, SLPI e alfa-1 antitripsina.

35. Kit, de acordo com a reivindicação 34, caracterizado pelo fato de que as proteínas de biomarcador são selecionadas do grupo que consiste em CA125, HE4, glicodelina, MMP-7, SLPI, PLAU-R, Muc-1, inibina A e PAI-1.

36. Kit, de acordo com a reivindicação 34, caracterizado pelo fato de que o kit compreende ainda

produtos químicos para a detecção de ligação de anticorpo às proteínas de biomarcador.

37. Kit para executar o método de triagem, de acordo com a reivindicação 1, como um teste único,
5 caracterizado pelo fato de que o teste compreende as primeira e segunda etapas de ensaio.

38. Kit caracterizado por ser para executar a primeira ou segunda etapa de ensaio do método de acordo com a reivindicação 1.

FIGURA 1

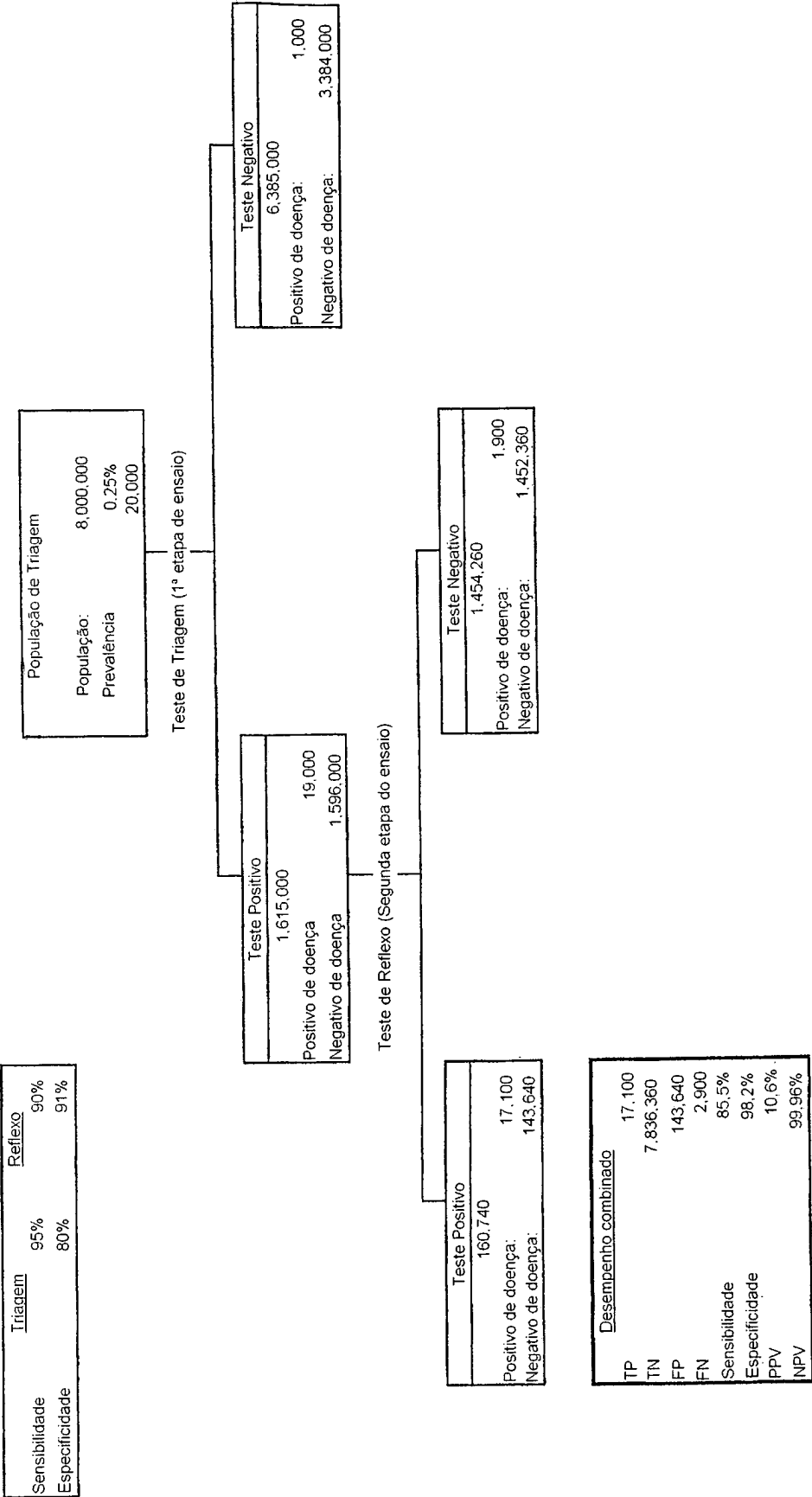


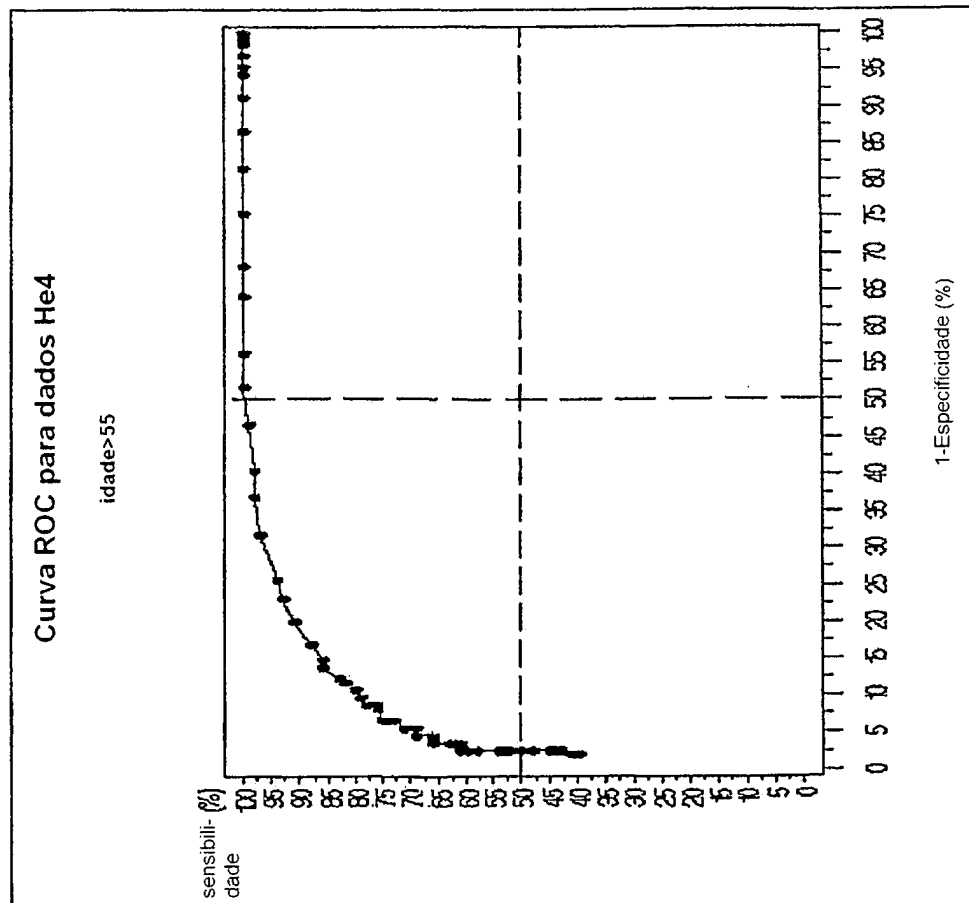
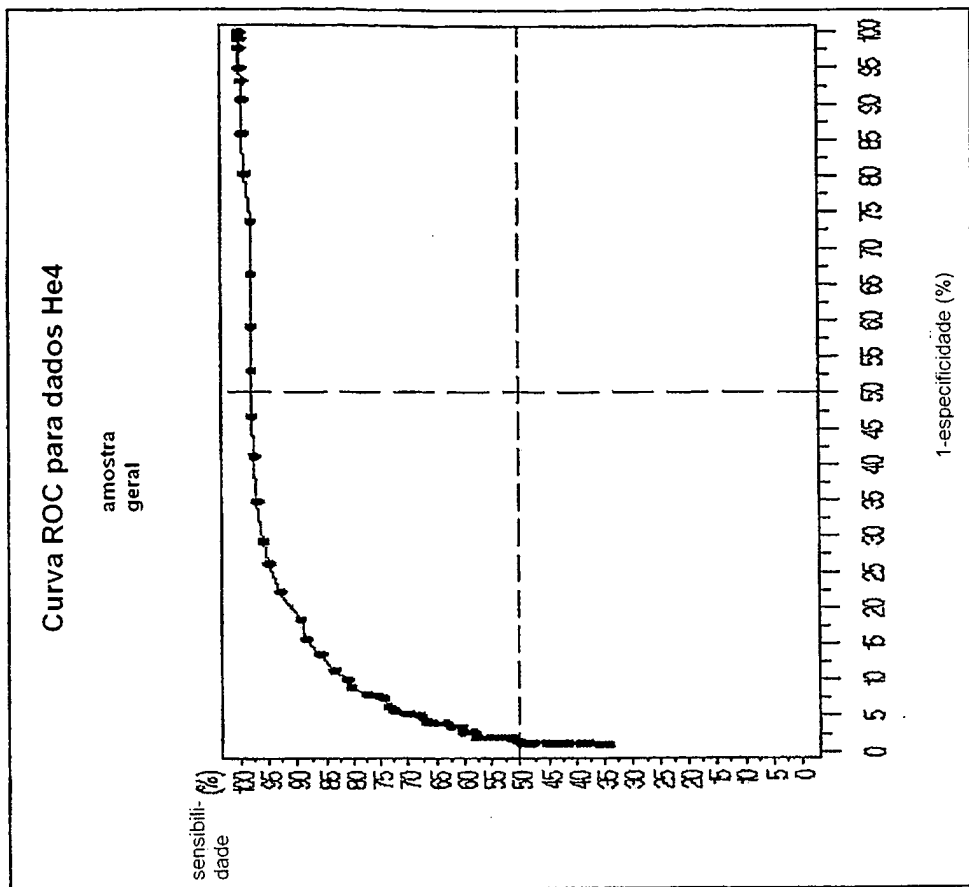
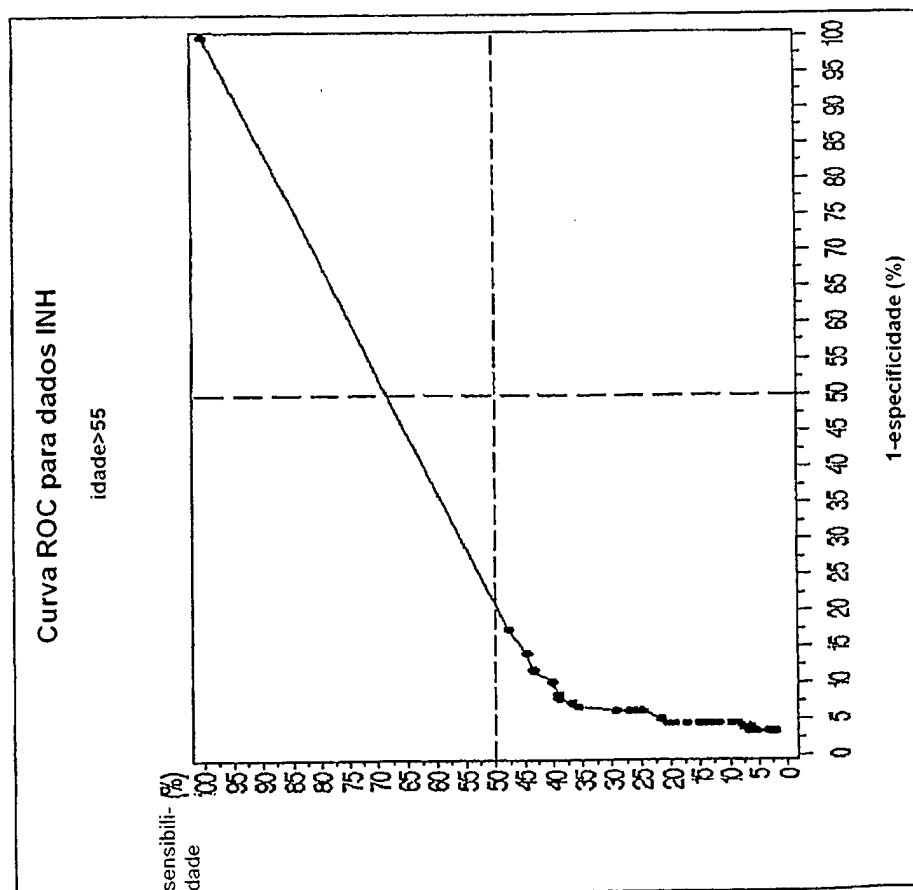
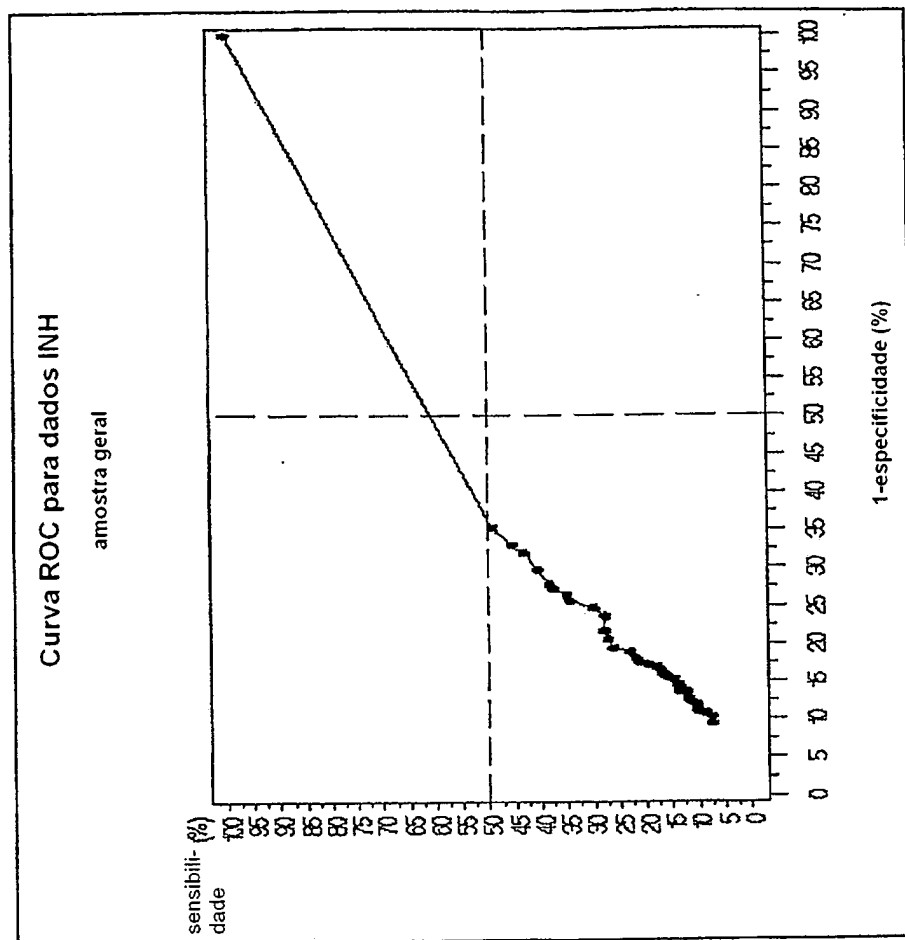
FIGURA 2**A****B**

FIGURA 3

A



B



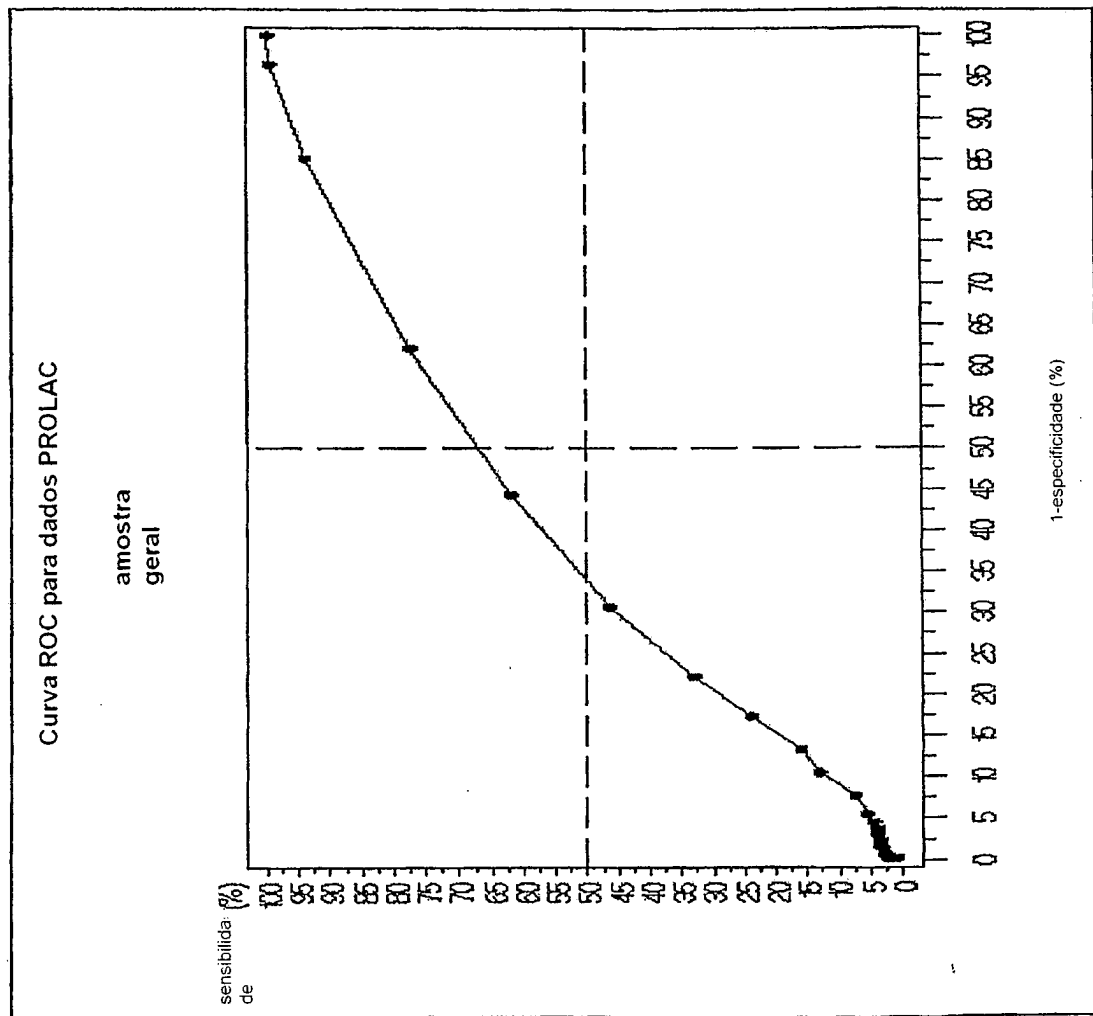


FIGURA 4

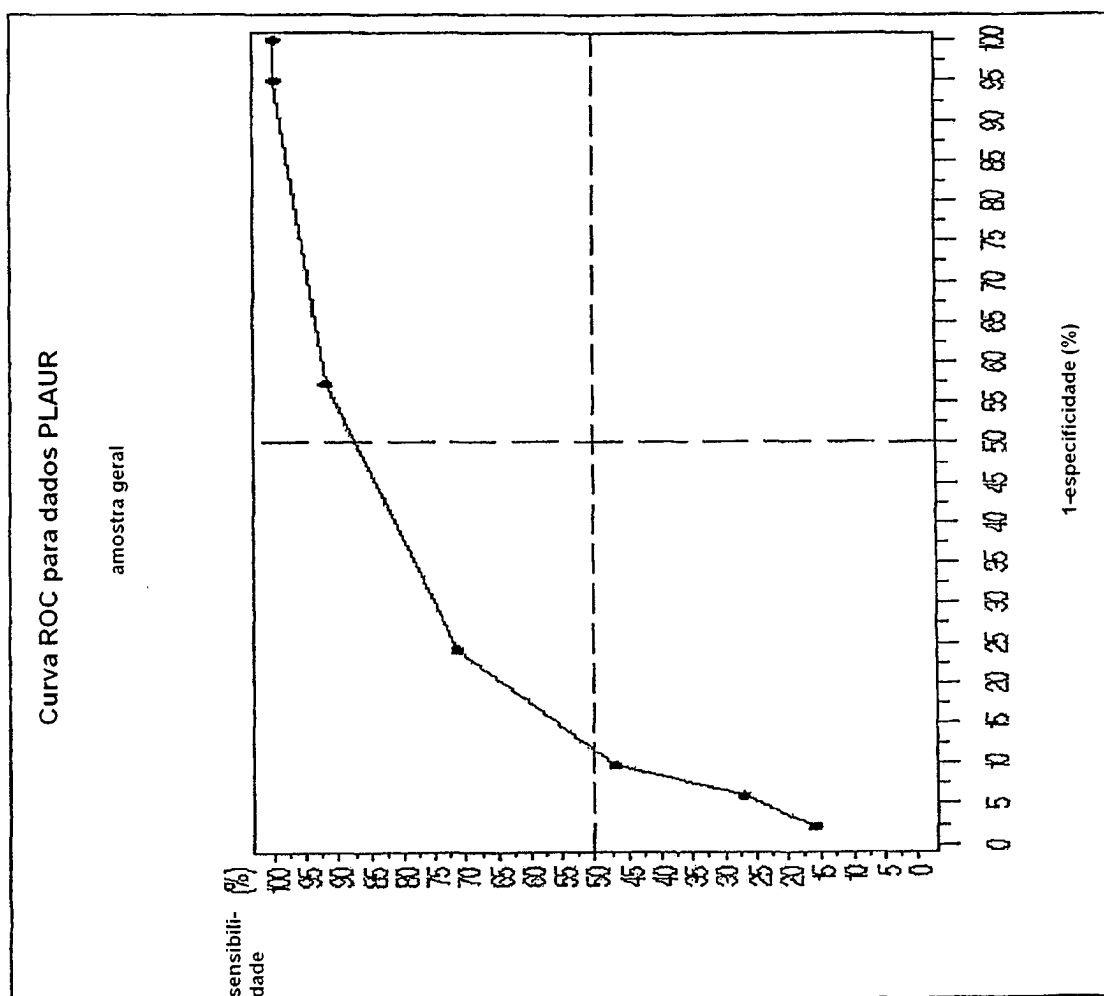
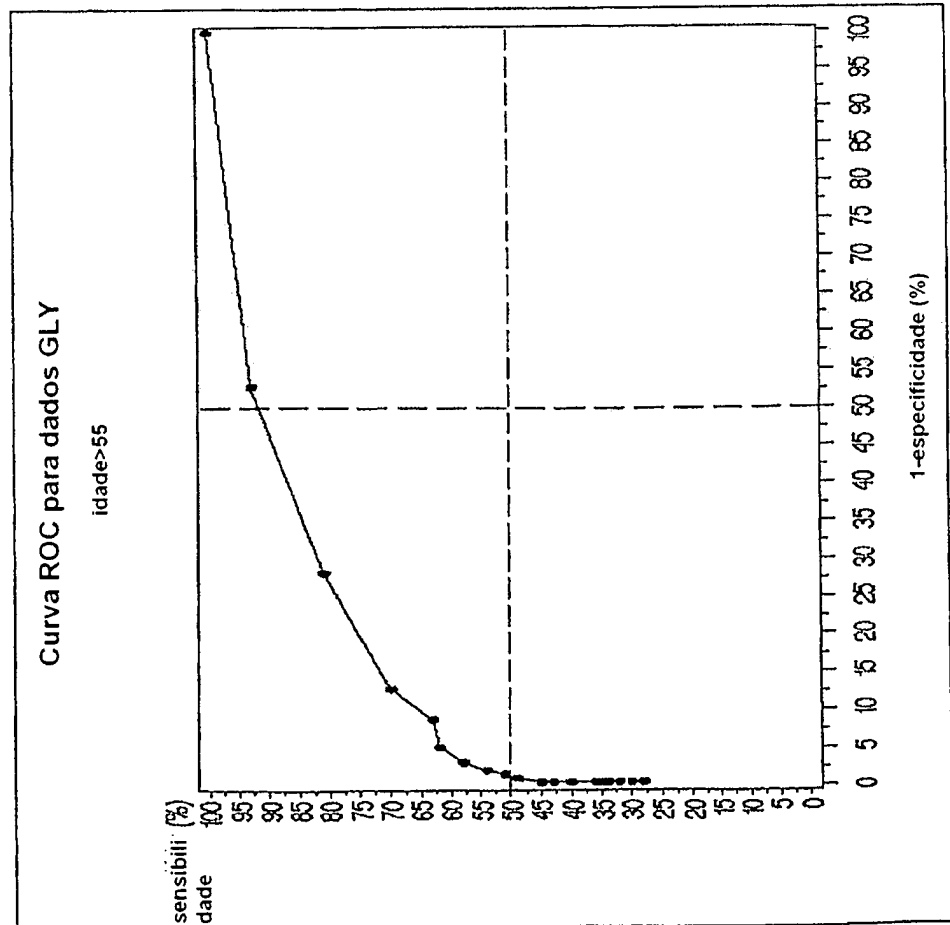


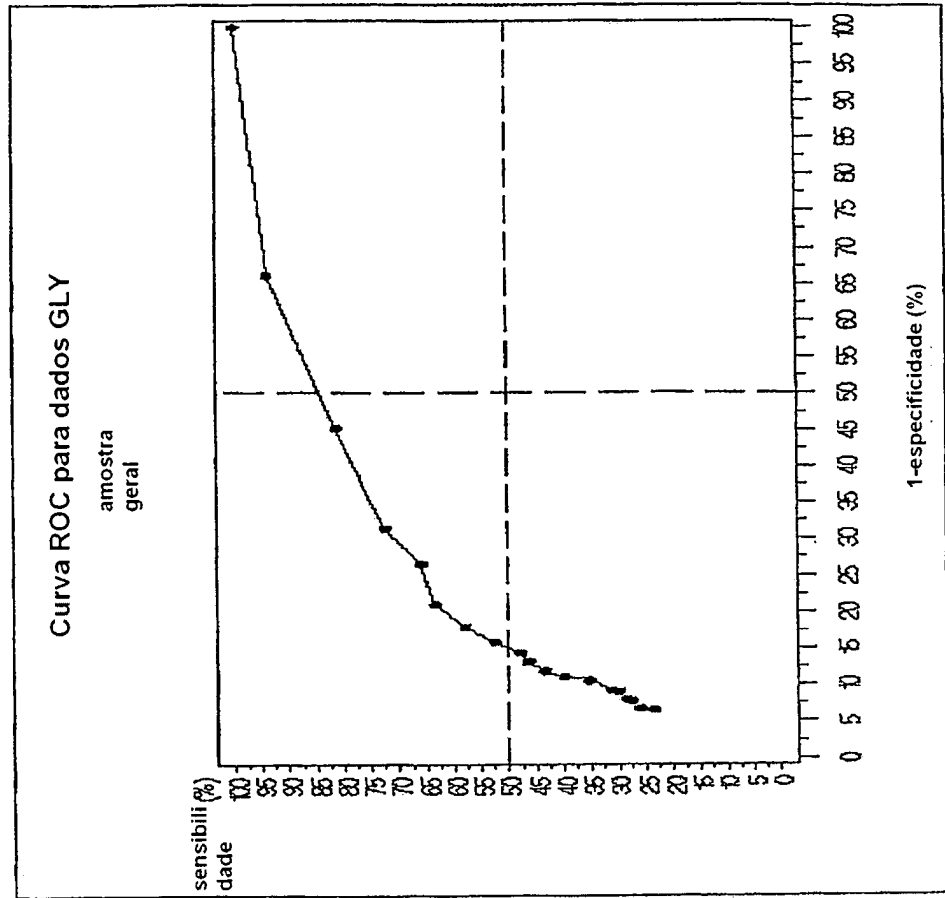
FIGURA 5

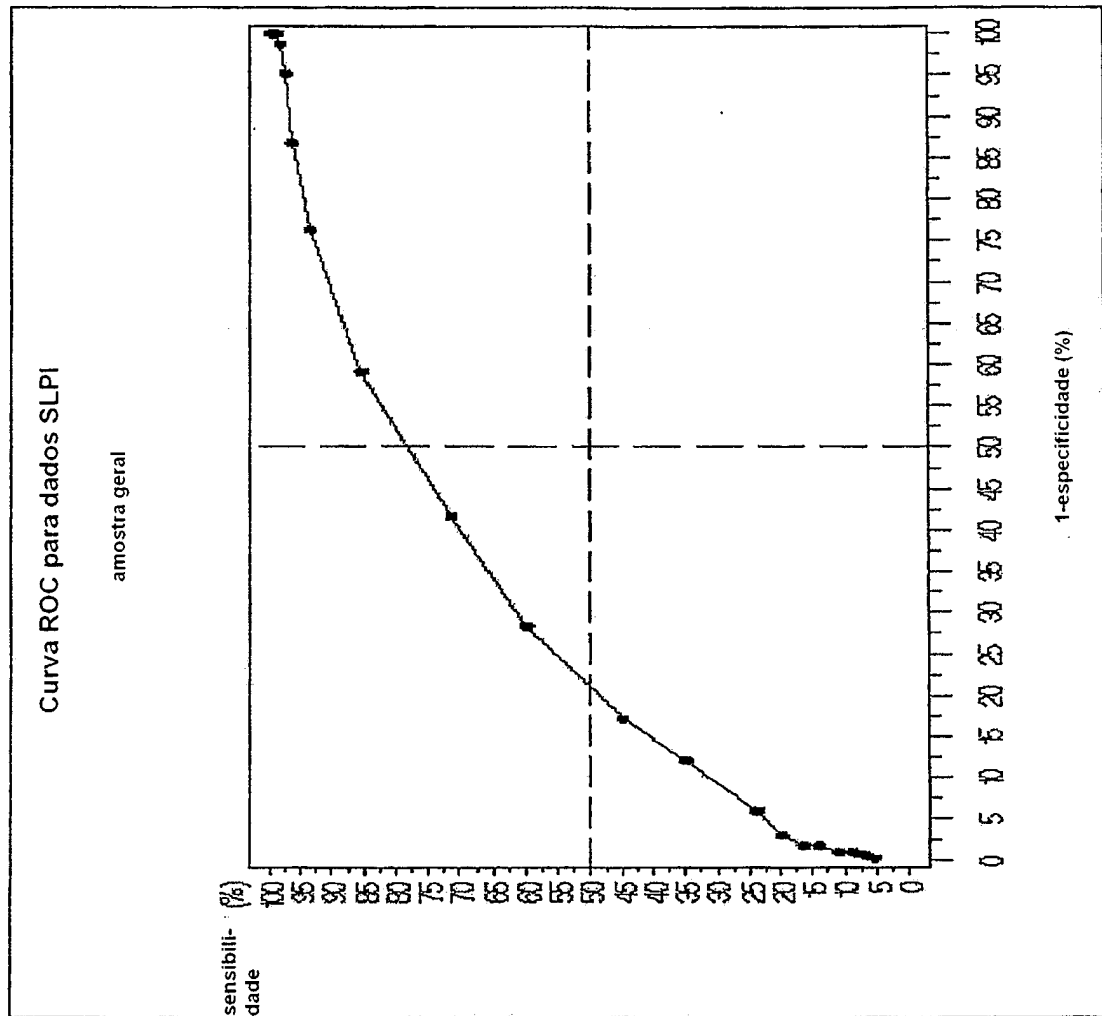
FIGURA 6

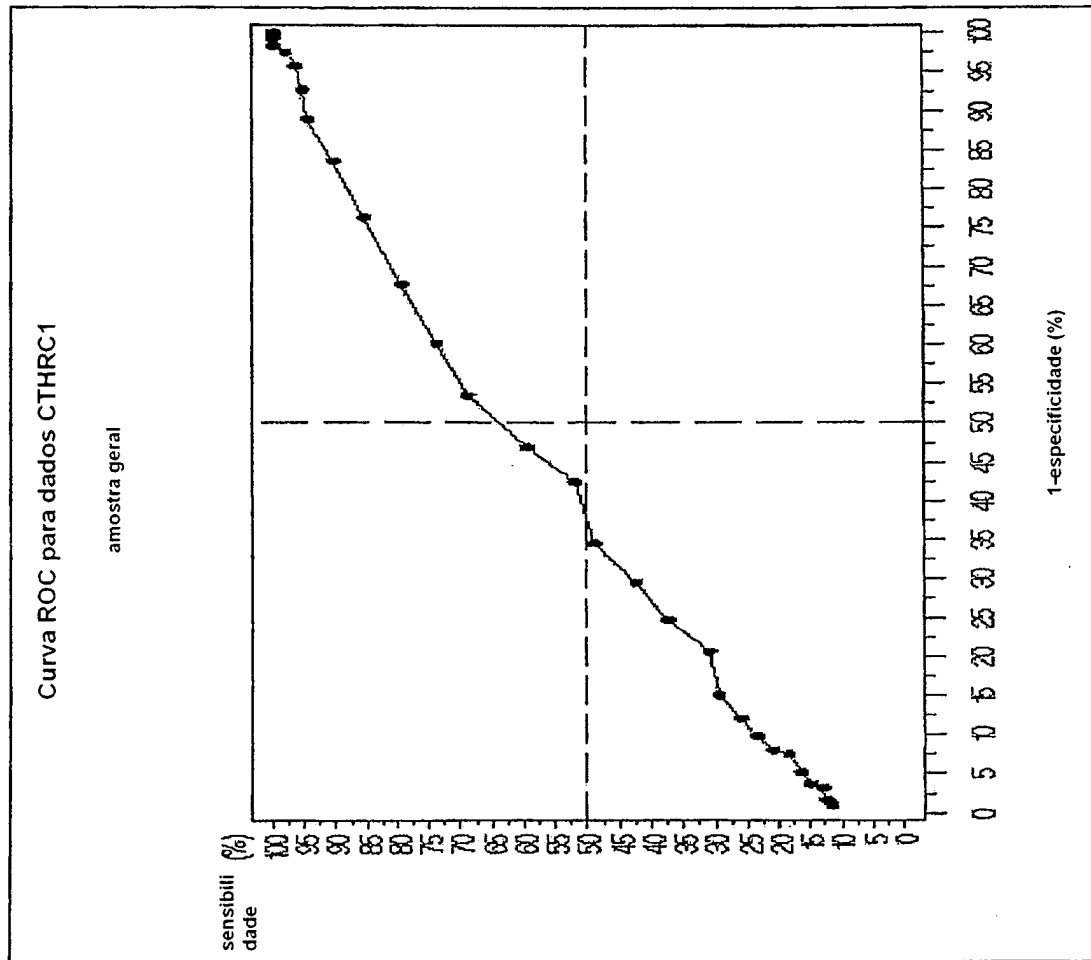
A



B



**FIGURA 7**

**FIGURA 8**

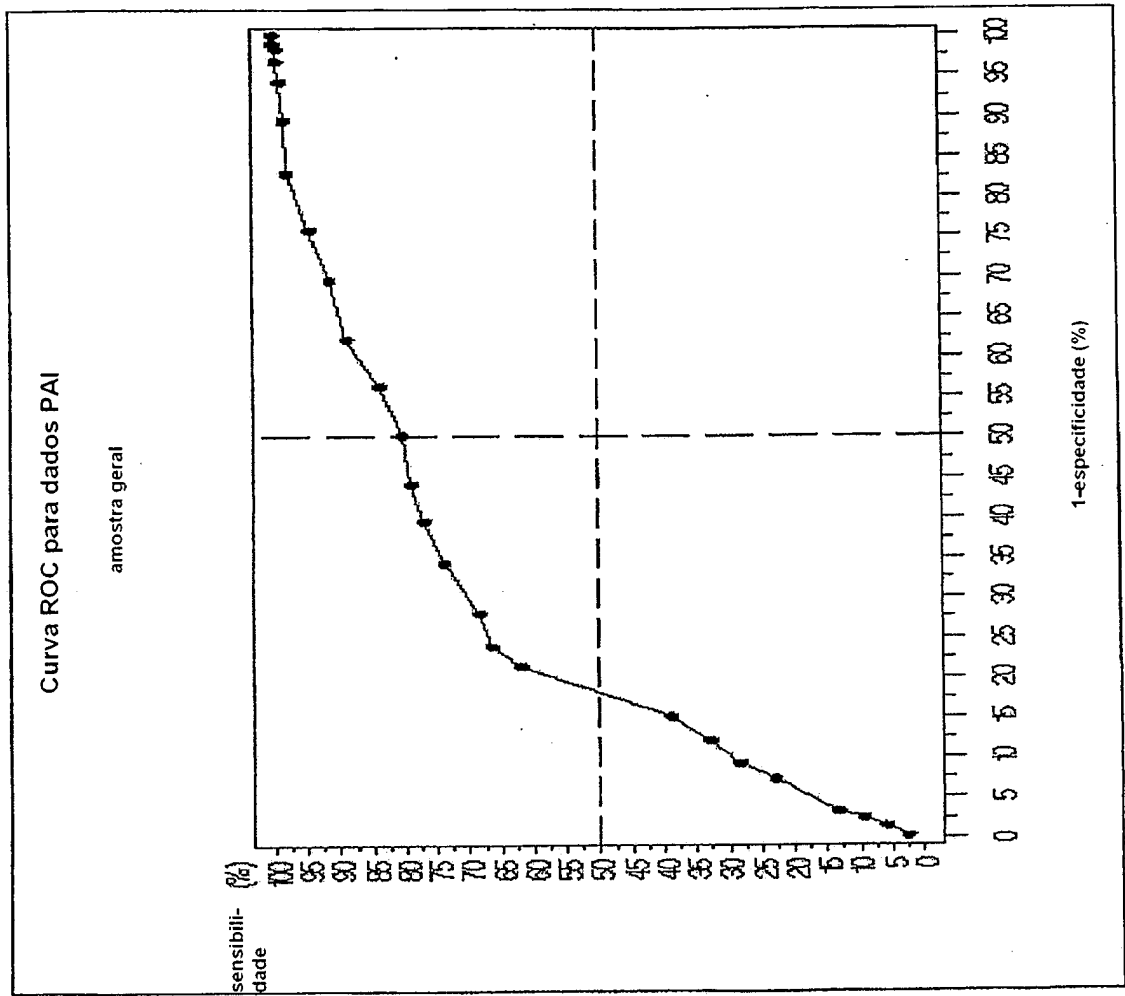


FIGURA 9

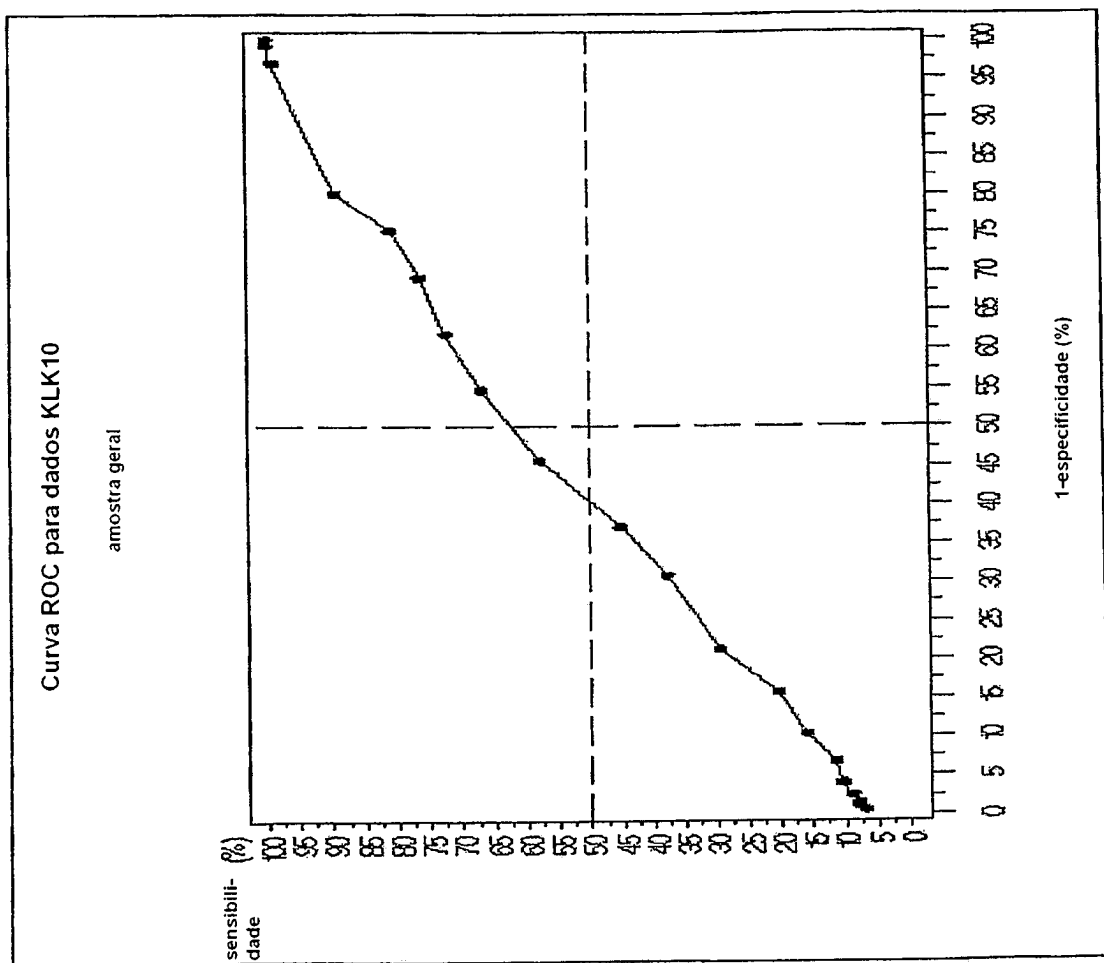
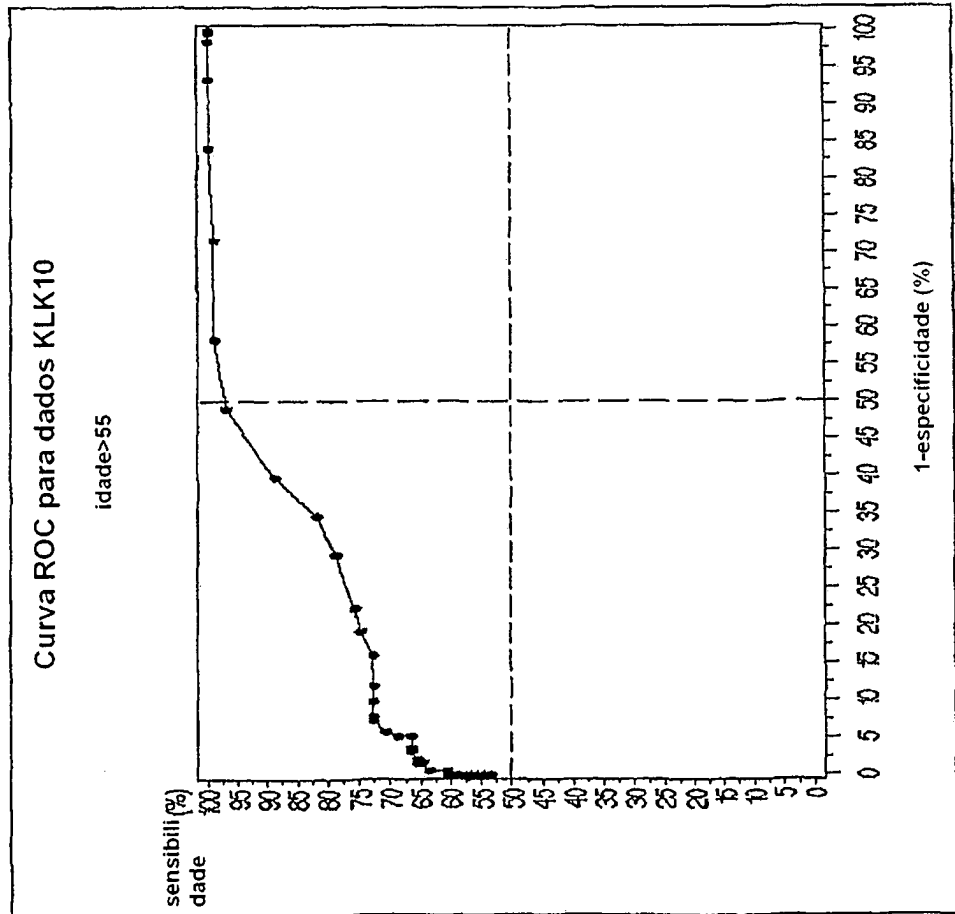
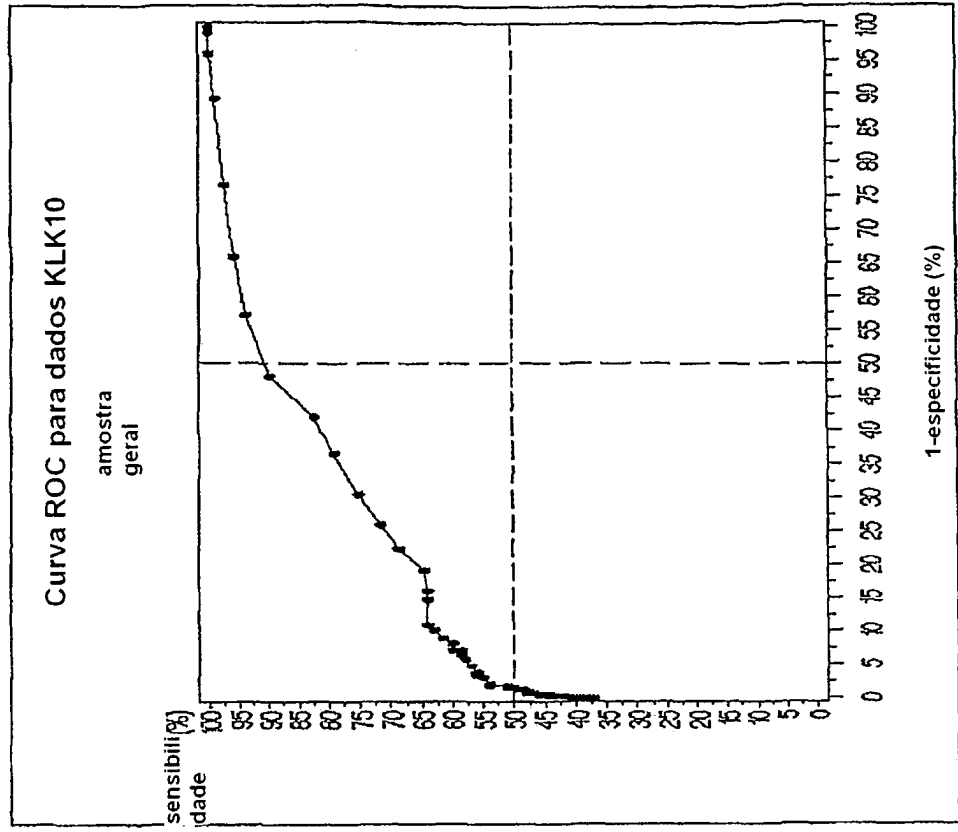
**FIGURA 10**

FIGURA 11

A



B



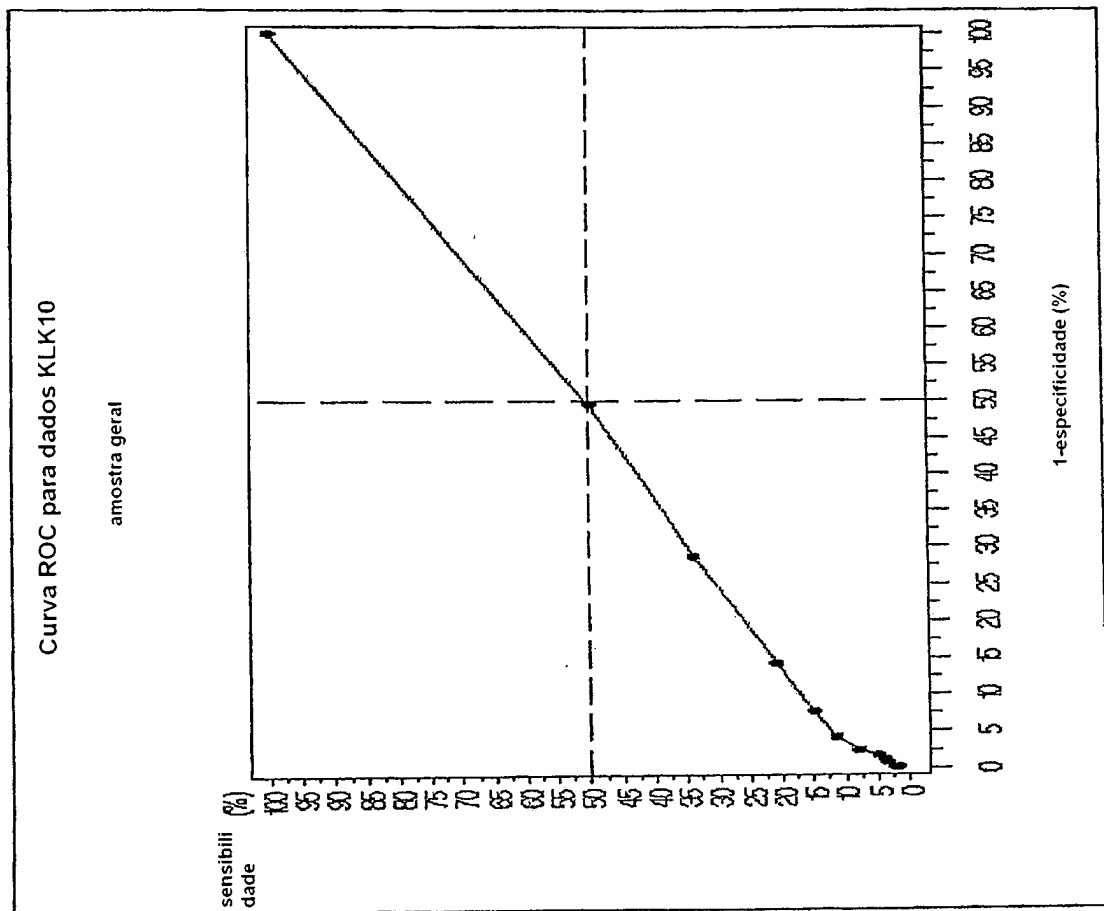


FIGURA 12

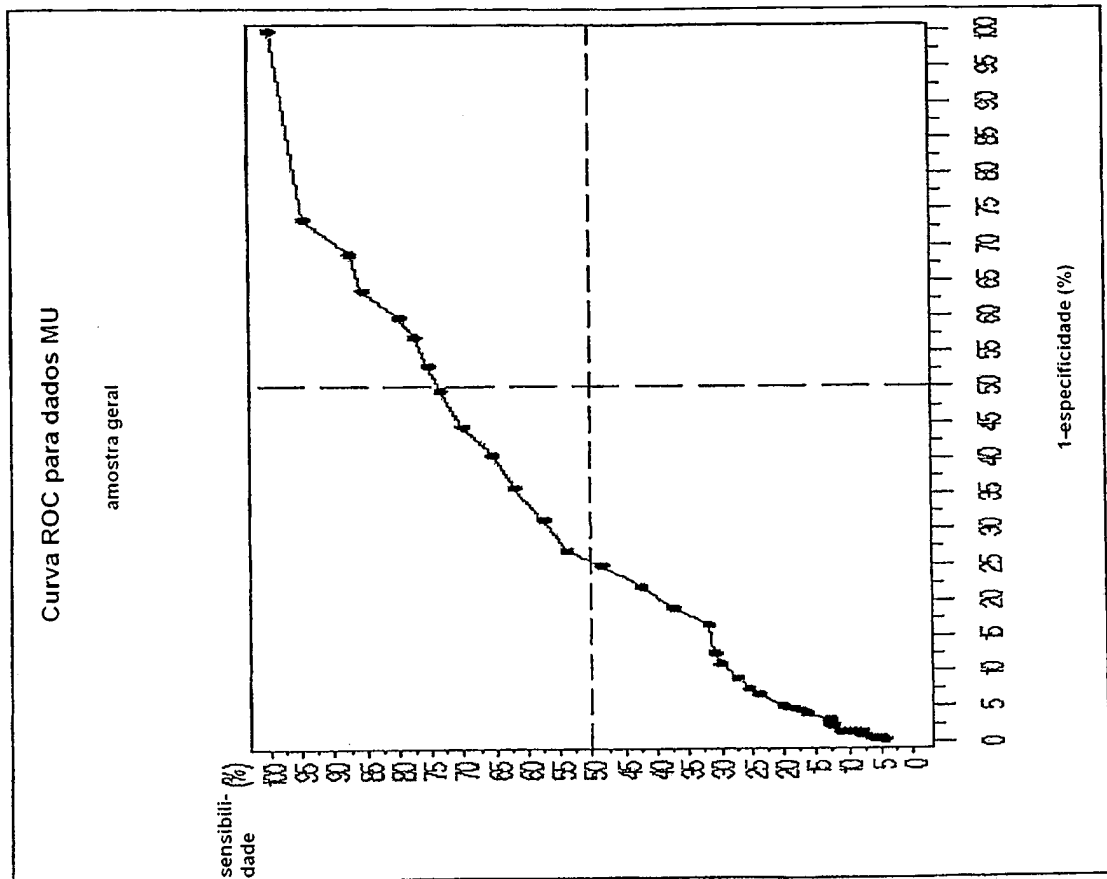


FIGURA 13

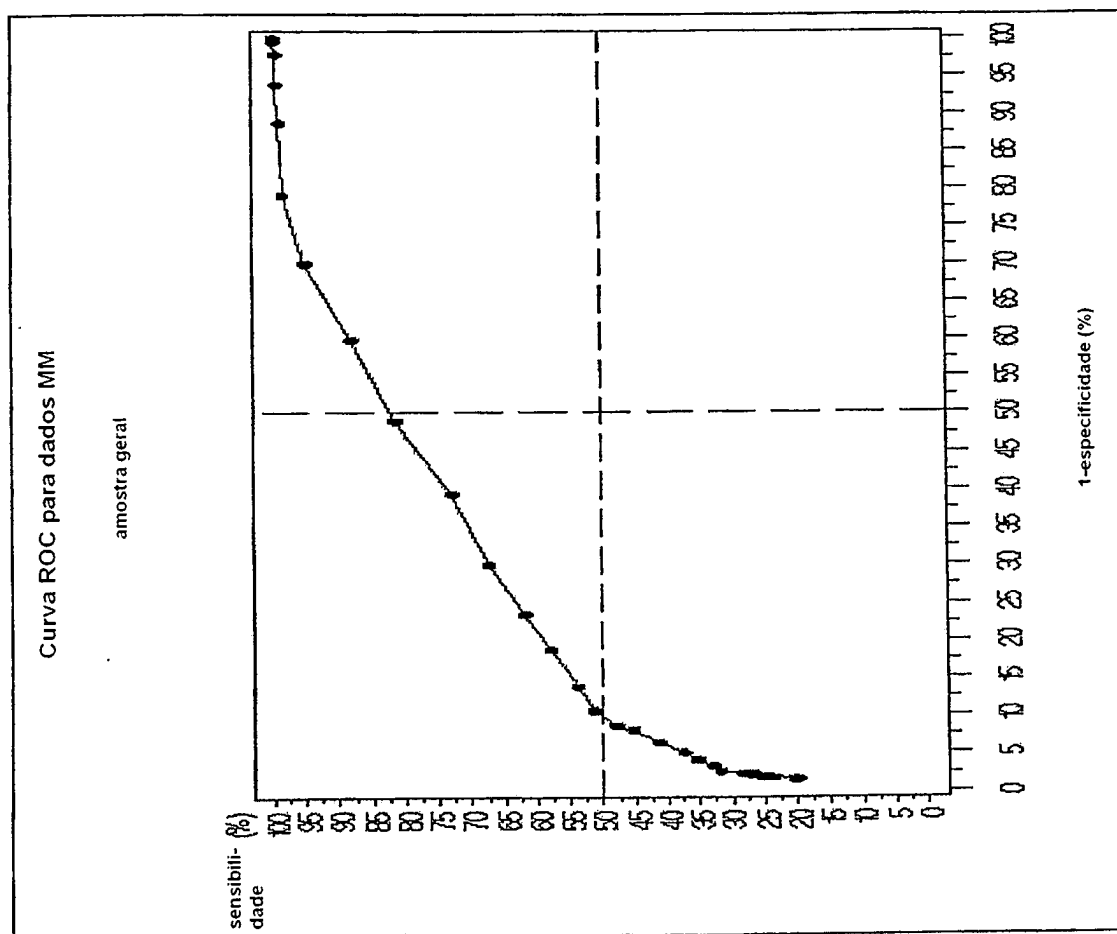


FIGURA 14

**MÉTODOS PARA IDENTIFICAR PACIENTES COM MAIOR PROBABILIDADE
DE TEREM CÂNCER DE OVÁRIO E COMPOSIÇÕES PARA OS MESMOS**

São fornecidos métodos de triagem para identificar pacientes com probabilidade aumentada de terem câncer de ovário. Os métodos de triagem envolvem a detecção de expressão de uma pluralidade de biomarcadores em uma amostra de corpo, em que a superexpressão dos biomarcadores é indicativa de probabilidade aumentada de ter câncer de ovário. Os métodos de triagem podem compreender ainda uma

10 análise de duas etapas. Biomarcadores de interesse incluem genes e proteínas que estão, por exemplo, envolvidos em defeitos em replicação de DNA/controla de ciclo de célula, crescimento e proliferação de células, escape de apoptose, angiogênese ou linfogênese, ou os mecanismos de motilidade

15 e invasão de células de câncer. Em alguns aspectos da invenção, a expressão de um biomarcador é detectada no nível de proteína utilizando um anticorpo específico de biomarcador ou no nível de ácido nucléico utilizando técnicas de hibridização de ácido nucléico. Os métodos para

20 detectar câncer de ovário em pacientes são adicionalmente revelados aqui. Kits para pôr em prática os métodos da invenção são adicionalmente fornecidos.